

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

10-2003-0077256 원 범

Application Number

2003년 11월 03일

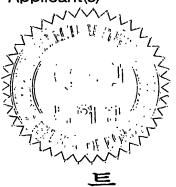
녀 Date of Application

NOV 03, 2003

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

인 : 조아제약주식회사 1명 춢 원 외 CHO-A PHARM CO., LTD., et al. Applicant(s)



2003

년 11

월 04

일

COMMISSIONER

출력 일자: 2003/11/11

【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2003.11.03

【발명의 명칭】 돼지의 유로플라킨 !! 유전자의 프로모터 및 이를 이용한 유용

단백질의 생산 방법

【발명의 영문명칭】 Porcine uroplakin II promoter and the production method of

useful proteins using said promoter

【출원인】

조아제약주식회사

【출원인코드】 1-1998-100521-4

【출원인】

【성명】 김진회

【출원인코드】 4-2002-032316-9

【대리인】

【명칭】 특허법인다래

【대리인코드】 9-2003-100021-7

【지정된변리사】 박승문, 조용식, 윤정열, 김정국, 안소영, 김희근, 권경희

【포괄위임등록번호】 2003-074626-1 【포괄위임등록번호】 2003-074151-0

【발명자】

【성명】 김진회

【출원인코드】 4-2002-032316-9

【우선권주장】

【출원국명】 KR

【출원종류】 특허

【출원번호】 10-2002-0067856

【출원일자】 2002.11.04

【증명서류】 첨부

【심사청구】 청구

【미생물기탁】

【기탁기관명】 생명공학연구원 유전자은행

【수탁번호】 KCTC 10352BP

출력 일자: 2003/11/11

【수탁일자】

2002.10.17

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】

13

【서열목록의 전자파일】

첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의

한 출원심사 를 청구합니다. 대리인

특허법인다래 (인)

【수수료】

【기본출원료】

20

1

면

29,000 원

【가산출원료】

54 면

54,000 원

【우선권주장료】

건

26,000 원

[심사청구료]

12 항

493,000 원

【합계】

602,000 원

【감면사유】

중소기업

【감면후 수수료】

314,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.미생물기탁증명서[미생물기탁증명

서 및 번역문]_1통 3.중소기업기본법시행령 제2조에의한 중소기

업에 해당함을 증명하는 서류_1통

출력 일자: 2003/11/11

【요약서】

[요약]

본 발명은 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터, 이를 포함하는 발현 벡터 및 상기벡터를 이용한 유용단백질의 생산 방법에 관한 것이다.

본 발명의 프로모터는 높은 효율로 목적단백질의 방광 특이적 발현을 촉진한다.

본 발명의 프로모터를 이용하여 목적단백질을 발현하도록 형질전환된 동물은 소변 중에 목적단백질을 고농도로 분비하며, 이렇게 하여 생산된 단백질은 기존의 동종 단백질이 나타내 는 것 이상의 우수한 생리활성을 나타낸다.

따라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동물은 의약학적으로 중 요한 가치를 지닌 유용단백질의 생산 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터 및 이를 이용한 유용단백질의 생산 방법 {Porcin uroplakin II promoter and the production method of useful proteins using said promoter}

도 1은 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터를 분리하는데 사용된 프로브와, 상기 프로브에 의해 분리된 클론들의 구조를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

도 3은 돼지 유로플라킨 II mRNA의 방광 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 4는 돼지 유로플라킨 Ⅱ 단백질의 방광상피 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 5는 돼지 유로플라킨 II 단백질의 방광세포 중 발현율 및 우산세포 특이적 발현을 나 타낸 도이다.

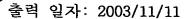
도 6은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐에서 EPO mRNA의 방광 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐에서 EPO 단백질의 발현을 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEP0의 구조를 나타낸 도이다.





도 11은 본 발명의 발현 벡터들의 EPO 유전자 발현량을 비교하여 나타낸 도이다.

도 12는 본 발명의 발현 벡터들의 EPO 단백질 발현량을 비교하여 나타낸 도이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- 본 발명은 돼지의 유로플라킨 Ⅱ(uroplakin Ⅱ) 유전자의 프로모터(promoter) 및 이를
 이용한 유용단백질의 생산 방법에 관한 것이다.
- 의약 분야에서 경제적 부가가치가 높은 EPO 등의 생산을 극대화하는 방법으로서, 세포배양법에 의한 대량생산방법이 주로 사용되어 왔다. 그러나, 이 방법은 동물의 혈액을 배양 배지로 이용하기 때문에 생산 비용이 높아지고, 배양기술에 있어서 전문적인 지식이 요구된다. 또한 배지성분에 함유된 동물의 EPO와 새로 생산한 EPO를 완전히 분리하는 것이 불가능하기 때문에 최종적으로 얻는 EPO의 순도가 낮고, 활성이 낮다는 문제점이 있다.
- 한면 형질전환동물을 이용한 유용단백질 생산 방법은, 동물이 분비하는 체액 중에 목적 단백질이 포함되므로 기존의 세포배양법에 비해 목적단백질의 분리·정제가 용이하며, 활성 또 한 우수하게 유지되므로 이 분야에 대한 관심이 급증하고 있다.
- 현재까지의 형질전환동물 생산기술에서 목적단백질을 생산하는 조직은 주로 단백질 발현율이 높은 것으로 알려진 유선 조직이었다. 그러나 동물실험 결과, EPO와 같은 몇몇 중요한 단백질의 경우, 우유(milk)에서의 발현은 유선조직 이외의 타조직에서의 발현 때문에 궁극적으로 목적단백질을 생산하는 것이 불가능한 것으로 나타났다. 또한 우유에는 원래 알부민 등 여러종류의 단백질이 다량 포함되어 있으므로, 결과적인 목적 단백질 수율은 낮아진다.

- 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 방광을 이용한 유용단백질 생산방법이 최근 시도되고 있다.
- '18' 방광은 동물의 연령이나 성에 상관없이 일생에 걸쳐 소변을 생산하며, 소변 중에는 단백질 및 지방 성분이 5~25mg/ℓ수준의 극소량만 포함되어 있어 목적단백질의 분리 및 정제가 훨씬 용이하다.
- <19> 그러나 지금까지 개발된 방광특이적 프로모터를 이용하여 형질전환된 동물의 단백질 생산 효율은 실제로 매우 낮은 수준에 머무르고 있다.
- COD 따라서, 목적단백질 발현을 높은 효율로 촉진하는 방광 특이적 프로모터의 개발이 시급하다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

∠21> 본 발명에서는 돼지의 방광에서 특이적으로 목적단백질의 발현을 촉진하는 유로플라킨 Ⅱ 유전자의 프로모터를 분리하고, 이를 이용하여 유용단백질을 대량 생산할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <22> 본 발명은 돼지의 유로플라킨 Ⅱ 유전자의 프로모터를 제공하다.
- <23> 본 발명의 돼지 유로플라킨 Ⅱ 프로모터는 구체적으로 서열번호 1의 염기서열을 갖는다.
- gggctaggagtggaatcagagctggcctatgccacagcagcagaatccaaaccacatctccgacctacaccagaccgtca
 ccataacacaggatccttaacccactgagcaaggtcagggatcaaacccaaatcctcatggatactagtcgggttcttaacccgctga
 gccacagtgggcactcctgtttttgtttgtgtcttcgttttttggctgcatctgcagcatacagaagttcctgggttaaggattgaac
 ccatgccacagcagcaacccgagccacagcagtgacaacagcctgatccttaactgctagaccaccagggaacgcccctcaactttt



 $\verb|ctgcaacctacactacagctcatggcaacaccggatcgttaacccactgagcaaggccaggggatcgaacccgcaacctcatggttcc||$ tagtcagattcgttaaccactgcaccatgacaggaactcccaacctgacaattttatcatttctgcaccctagttgttgagtaatttgaaaaattcccaagatgtcaaggtcagtgtgatggttaattttatgtgtcaacctgactaggccatgttgcccggatgtggagtcattg catcagaaacaaatccgactaggaaacaagcggttgcaggttcgatccctggcctcacttagtggagtcaggatctggcgttgccgtg agctgtggtacaggtggcagatgcagctcggatctagcattgctgtggctgtggtgtaggccagcagctgtagctctgattaaacccc a a ag cagat taccccata at at gggt gggt ct cat caa gt t catt gt aggccct ag t ggaac aa agaccgacct ccacct tctccccatgaga aggaa agaatt ctgccaa aagaccgccttnggacntaa actgcaactctttcctgagtttccagcatgttgggttggttctgtttctccagagaaccctgactaacgcagtctgcacccctgaagaccagtggtccccacactcagctgggtgtcacctc $\verb|ctcagccttgcaaaagtataagctttctctgcaccactgccccattcttctctgcagacagggtcattcctaaagccaaacgctaa||$ tgcctccacctctgatctgagtcccatcttttccctcctccagaagcttcctcataaattctacccccttttcttccttatcttatc tggcccagcatagtaggttaaggatccagtgttgccacagttttggcttagattgaaactgcagctcagatctggtccctggcctggg $\tt ctccagttatctctctttcccttcccagccaagctctgcaaagagcggtctgcacagttctaactctacctcctcccagttggccc$





ggagcctcaattccttgtcacgtggacctcccttggagggggtcccatgtcctccatggtgagtaatccatgagagcaaggtggaag $\tt gtgccatgccatttaggacctagcctcaggagggacctacgtcacttctgttgtagtctgttggccacacagactaaccctgacacaa$ tgcacccatccatgacctgctgccagtccattctccacactgtttccagaatgatatttacataagtaaaactcctcaaaggcttttg agattttttttcccattatagttgatttataacctcagaggcttttgttttcttcagcataaaaaccaagttccttaacatagcatgt a acceact g g c cagt g g c taga act ct caccat g t c cat c ctt g a at a ct g c t t t ct a g c caa g a g c t a t t g t t g cagt g consideration of the consitcccagaatgtgtcgggataactcacatctctgagccttttcatgtgctgttccctcactttggaatatccccttccatttaggaagggcatatggaggttcccaggttagccatcaaattggaattgtagctgctgcctacaccacagccatagcaacaccagacccaagtcac at ctg caaccta cat cacagat cat gg caat act gg at cctta acccact gag t gag cccag gg at caa acaca a at tct cat gg at a companion of the compani $\verb|ctcgccaggttcattaccactgagccacaacaggaactcctctctttttatggtcacacctgcagcatatggaagttcctgggccag|$ ggattgaatctgagtggcagctgtgacaatgccgtatcctttaattcactgtgctgggctgaggggntaaantgcccctcctaaaaaa cctgagctgctgcagttggattcttaatccactgcaccacaagggggaaggtcaagaactgtcttgccatctctgtatcttatcacct gtaacaaacctgactagcattcataagaacttgggttcgatccctagcctcagtgggttaaggatgcagcattgctgtgagctgtggt ctgtggcctgtgtggtatacaagtaacagctgatccatgtctcagtcatgtttccccctcagactacctttcctgccccatctctccc tttgacataattggaaaaacaaattcagaattttgtcccactac



tagtatcctggtgagacagattttttttttccttttatggttgcacgtgcaacatatggaagttcctgggctggggtcgaattggagctgagattggagctgagattggagctgagattggagctgagattggagctgagattggagctgagattggagctggagatttg cagg tg ct tg cct at g cca cag ccat g g caa cat cat at a caa a ccg cacct g tg a cct a cacca cag at tg cag caa cg ct g g a tg cag cat g cat g cag cat g cat gcaactgagattttcttactctcacagctttttccagcttcatatccaaggacagacgctctgccattttcccatcagaccaatatttg $\verb|ctgaacactgcacctttacttttaggtccaagtcaccaggggttttcccagtttgctcctacagattctgacactatctccacatttt|$ ${\tt aaaattgaggttcaaagtgactcaccaaaagtcatatagcatcactcctcaacaggaggacagcagtccccaccagagggtaacatgt}$ $\verb|cccccatcctggtgcagtggaaacaaattcaactaggaactgtgaggttgtgggttcgatccctggccttgctcagtgggttaaggating the control of the control of$ ctggcgttgccatgagccgtggtgtaggttgcagactcaactcagatctggcgttgctgtgactgtggctgtgatgtaggctggcagc a a a gagga att ccctt at ggct cag caggt ta aggat ctggt att gt cact gct gt ggct ct agt ta cag ccat agt gcaggt t caatccctggcccaggaacgtctgcatcccacaggtgtggccaaaaaa



cagtgggtaaggagccagtgttgctggtcaaaaaagaaaagaaaagtaccatagttagagtaaatctgttttaggagctattctttg gggcagaacagagagatcaggagctccttgagagcagaaacttacctttacatccctcgtgcctagcacggttctaggggcatacctg $\verb|ctcccaagtgcaagtgtaaacancntcctgggttggcaatgggatctgaagagtactaagatccctcagacctggaattccaccattt| \\$ agt cttt ccctctctccaa agt tctcaa tgtg caa aagat cctcttt cagt ttg cagag caatgat aggat cttctaa aaggag acaaa agc caagg t g caggaa aa aata g aatt cagt t ctt cacc caa agg cag cct g t cct g g g aga cagg g g t g aa ac act t g g t cct g at compared to the compared toagagtag cat caat caat gttacctg gaag ctt gttag aaat gcag aat tt cag gcttcacct cag acccact gaat cag aaact gcag aat gaag can be a substitution of the contract of the contract grant grantgttctacctttattgtcacctcgtctcacctcgtgctcataccc

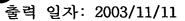


caggctttgagcctacccttcccccatggggaaaggacacaaggccaccagccctcacttccctaccaggaccctggccctcctct ccacagccacagcaatgtgggatctgagccacgtctgcaacctacaccacagctcacggcaacaccagatccttaacccactgagcaa ggccagggatcgagcccacgtcctcatggatgctagttgggttcgttaaccgctgagccatgatgataactcctctttctattcttta gtcacaaacagtcaacaaaggttgctgaccaaggctgatcgtgccacccccaagcccccagactgggccagtgcccacccttggg tctctctggaaatcctgcccagcatcaattggctccactctccaggaggatgggaagccctgtggcccctgggactcacacccctctgcatctcccagagtgcaggacctggtcttcaggagacaccaagaactggctccccggctctgctgcccccacccctactaccagttt ggaacacccactaccacgtgggagaaggggtcgtctaggggttgggccccagatacacttgtaagcaggaacacacgagcccttacatgtgggtgtcccggaagaagggggttttccacccccgctttagtcaccctgccctctgcagctgcctgagccaccaagacccagcca aggtctcctgccttctggcctgagggccagctccccatcctgaaaaaacctgtctgggggcctcccctgaggctgtagggcccaaggcctcccctgaggctgtagggcccaaggggcaggttgaacaggattcccctctggcccctcctaccccaggacaaaaccagagccccagg acagggcctcacttgcctcaggaaaccacagcttgccagcacccagcccagcaccagcccagct

또한 본 발명의 돼지 유로플라킨 Ⅱ 프로모터는 상기 서열번호 1의 염기서열

에 하나 이상의 붕괴(disruption), 결실(deletion), 삽입(insertion), 점(point), 치환 (substitution), 논센스(nonsense), 미스센스(misense), 다형현상(polymorphism), 재배열 돌연 변이(mutation)가 일어난 기능적 등가물 중 선택된 하나가 될 수 있다.

- 26 본 발명은 상기 프로모터의 전체 또는 일부를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터를 함께 제공한다.
- 27> 본 발명의 발현 벡터는 구체적으로 상기 프로모터를 포함하며, 그 3' 쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- ^{28>} 또한 본 발명은 상기 발현 벡터를 동물의 수정란에 도입하고, 상기 수정란을 이용하여 형질전환시킨 동물을 제공한다.
- 또한 본 발명은 형질전환동물로부터 소변을 수거하여, 발현된 목적단백질을 분리·정제하는 방법으로 이루어진 유용단백질의 대량생산방법을 함께 제공한다.
- 본 발명의 프로모터는 돼지의 유로플라킨 II 구조유전자의 5'쪽에 위치하여 유로플라킨
 II 구조유전자의 발현을 조절한다.
- 본 발명의 프로모터는 돼지의 게놈 라이브러리(genome library)를 스크리닝(screening)
 하여 분리할 수 있으며, 그 분리 방법은 다음과 같다.
- 주선 스크리닝의 프로브로 사용될 돼지 유로플라킨 Ⅱ 유전자의 염기서열 일부를 얻기 위해, 염기서열이 공지된 다른 동물들의 유로플라킨 Ⅱ 염기서열을 비교하여 종 간에 잘 보존 된 부분을 바탕으로 프라이머를 제작하고(정방향 프라이머: 서열번호 2, 역방향 프라이머: 서열번호 3), 돼지 방광의 전체 RNA(total RNA)를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행한다.





- ▶ RT-PCR을 통해 유로플라킨 Ⅱ 염기서열의 일부를 얻은 후, 이를 프로브로 하여 돼지의
 게놈 라이브러리를 스크리닝한다. 본 발명에서 사용한 프로브는 도 2에 나타난 바와 같이, 유로플라킨 Ⅱ 구조유전자의 2번 엑손부터 5번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 A, 그리고
 1번 엑손부터 2번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 B의 두 종류이다.
- 라이브러리 스크리닝 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 유로플라킨 Ⅱ 구조유전자 또는 프로모터 부분을 포함하는 클론들을 얻고, 이들의 염기서열을 비교하여 프로모터의 염기서열을 최종적으로 결정하여, 돼지 유로플라킨 Ⅱ 프로모터의 완전한 염기서열을 얻는다.
- 이렇게 하여 얻은 프로모터는 총 8847bp의 크기를 가지며, 그 염기서열에 있어서 세포에서 항상 일정하게 발현되는 유전자(housekeeping gene)의 특징인 높은 G/C 함량율을 나타내며, AP2 및 GATA 박스 등의 다양한 Sp1 엘레멘트(element)를 포함한다.
- 본 발명의 프로모터는 돼지의 여러 신체 조직 중 방광조직에서만 특이적으로 단백질을 발현시킨다. 돼지 유로플라킨 Ⅱ의 경우, 전체 방광세포의 8~14% 정도에서 발현되며, 특히 방 광상피 상부기저세포(urothelial suprabasal cell) 중 활발하게 증식하며 세포분열 중인 우산 세포(umbrella cell)에서 높은 발현율을 나타낸다.
- 37> 이처럼 본 발명의 프로모터는 높은 효율로 단백질의 방광 특이적 발현을 유도하므로, 본 발명의 프로모터를 이용하면 방광특이적으로 외부에서 유래한 목적단백질을 발현하는 발현 벡 터를 제조할 수 있다.
- 본 발명의 발현 벡터를 제조할 때는, 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여, 본 발명의 프로모터를 삽입하고, 그 3'쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염기서열을 삽입함으로써 제조한다.

- 본 발명의 발현 벡터에서, 기본 골격으로 사용되는 벡터는 일반적으로 사용되는 발현벡터 중 적절한 하나를 선택하여 사용할 수 있으며, 그 예로 다양한 클로닝 부위를 가진 pBluescript SK 계열의 벡터를 비롯하여, pLNCX 등의 리트로바이랄 벡터(retroviral vector) 등을 들 수 있다.
- 본 발명의 발현 벡터는, 의약품의 유효성분으로서 사용되는 모든 단백질, 즉
 EPO(erythropoietin), 알도스테론(aldosterone), 아드레노코티코트로핀
 (adreno-corticotropin), 혈액응고인자(blood clotting factor), 고나도트로핀
 (gonado-tropin), 인슐린(insulin), 프로락틴(prolactin) 또는 바소프레신(vasopressin) 등을
 발현시킬 수 있다.
- 또한 본 발명의 발현 벡터는 필요에 따라 조절인자들, 즉 또다른 프로모터, 인핸서 (enhancer), 선택적 표지 유전자(selective marker), 5'-UTR(untranslated region), 3'-UTR, 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal), 리보솜 결합 서열, 게놈의 특정 부위로 삽입될 수 있는 염기서열, 또는 인트론을 적절한 위치에 추가로 포함할 수 있다.
- 본 발명은 유로플라킨 Ⅱ 프로모터를 포함하는 발현 벡터의 바람직한 예로, 돼지 유로플라킨 Ⅱ 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 발현할 수 있는 발현 벡터 pUP2/hEPO를 제공한다(도
 3).
- 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEP0는 pBluescript SK(-) 벡터를 기본 골격으로 사용하며,
 본 발명의 유로플라킨 II 프로모터의 3'쪽에 인간 EP0를 암호화하는 유전자(Lin F. K. et al,
 Proc. Natl. Acad. Sci, USA, Cloning and expression of the human erythropoietin gene,
 82:7580-7584, 1985, 서열번호 4)가 융합되어 있다. 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEP0는 2002년
 10월 17일 한국 생명공학연구원 유전자은행에 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁하였다.



44>

출력 일자: 2003/11/11

본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEP0는 필요에 따라 네오마이신 저항성 유전자 (neomycin-resistant gene), 인슐레이터(insulator), 또는 WPRE(woodchuck hepatitus virus posttranscriptional regulatory element) 등을 추가로 포함함으로써, 형질전환 세포주의 구축을 용이하게 하며, 목적단백질 발현량의 극대화 및 발현의 안정성을 도모할 수 있다.

네오마이신 저항성 유전자는 세포주 구축시 사용되는 G418 시약에 대해 저항성을 나타내는 유전자로, PII 프로모터의 조절 하에 단백질을 발현하는 동물세포주(animal cell line) 구축시 효율적인 선택적 표지 유전자로서 작용할 수 있다. 네오마이신 저항성 유전자의 염기서열은 다음과 같다(서열번호 5).



<47>

출력 일자: 2003/11/11

· 인슐레이터는 프로모터 부근에 존재하는 조절인자의 영향을 돕고, 위치 비의존적인

(position-independent) 발현을 도와주는 인자로, UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 안정적

으로 발현할 수 있게 한다. 인슐레이터의 염기서열은 다음과 같다(서열번호 6).



ta agg c cattat ctct catcca act c cagga cg gagt cagt gagg at ggggctct ag agggga cagccccccc caa agcccc cagggang and the comparison of thetgta attacgtccctccccgctaggggcagcagcagccgcccggggctccgctccggtccggcgctcccccgcatccccgagccgcacctggggggatacggggaaaaagctttaggctgaaagagagatttagaatgacagaatcatagaacggcctgggttgcaaaggagctggaaatgacagaatgacagaatgacagaatgacagaacggcctgggttgcaaaggagctgaaagaagaatgacagaatgacagaatgacagaatgacagaacggcctgggttgcaaaggagacagaatgac $a cag t \verb|gctcat| ccagat ccaacccct \verb|gctat| g t \verb|gcagg| g t cat caaccag cag cccagg ct \verb|gcccagag| ccacat ccag cct \verb|gcct| g t cat caaccag cag cccagg ct | gcccagag ccacat ccag cct | gcct| cat caaccag cag cccagg ct | gcccagag ccacat ccag cct | gcccagag cccagag cccagag$ at at ccaacccaa acct cccct gtct cag tgta a agc catt ccccctt gtcct at caag ggg gag ttt gct gt gac at tgt tgg tct gas a constant of the constant graph of $\verb|gggtgacacatgtttgccaattcagtgcatcacggagaggcagatcttggggataaggaagtgcaggacagcatgggacatg|$ caggtgttgagggctctgggacactctccaagtcacagcgttcagaacagccttaaggataagaagataggatagaaggacaaagagc $\tt gatg caag cag agg ggt ccat gt ccct cagt gcca cat ccc cac agt t ctt cat cacct ccagg gac ggt gac ccc ccc ccct ccgt to the control of the co$ attatctctcatccaactccaggaacggagtcagtgag



WPRE는 mRNA의 안정화에 기여하여 단백질 합성량을 증대시킬 수 있는 조절인자로, UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 대량으로 발현할 수 있게 한다. WPRE의 염기서열은 다음과 같다(서열번호 7).

accaggitetgitectgitaateaaccietggattacaaaatitgitgaaagattgactggtattettaactatgitgeteet
titacgctatgitggatacgctgctitaatgcctitgtatcatgctattgcttcccgtatggctitcattitetectectitgtataaat
cctggttgctgtetetttatgaggagttgitggeccgttgiteaggeaacgtggcgtggtgtgeactggittigetgacgeaacceccae
tggttggggcattgccaccaccigtcageteetttecgggactitegetiteeccetecetattgccacggeggaacteategeegee
tgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgteggggaagctgacgtcetttccatggc
tgctcgcctgtgttgccacctggattetgegcgggacgtcettetgetacgtccttcggccctcaatccageggaccticettcccg
cggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgcctcagacgagtcggatctccctttgggcccccc
gtttcgcctcgggctcctcggg

본 발명은 상기 조절인자들을 추가로 포함하는 발현 벡터의 바람직한 예로, I/pUP2/hEP0
 벡터, pUP2/hEP0(WPRE) 벡터, I/pUP2/hEP0(WPRE) 벡터를 제공한다.

상기 벡터들은 본 발명의 pUP2/hEPO 벡터에 네오마이신 저항성 유전자를 삽입한 후, EPO 유전자의 3'쪽에 WPRE를 삽입하거나, 또는 UPII 프로모터의 5'쪽에 인슐레이터를 삽입함으로써 제조한다.

<53> 본 발명의 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 동물은 소변을 분비하는 모든 동물, 즉돼지, 생쥐, 소, 닭, 양 또는 염소 등이다.

- 본 발명의 발현 벡터를 이용한 형질전환동물의 생산 방법은 통상적인 방법에 의한다. 형 질전환하고자 하는 동물 중 건강한 개체로부터 수정란을 채취하고, 수정란에 본 발명의 발현 벡터를 도입한 후, 정관결찰 생쥐를 이용하여 위임신 생쥐를 얻고, 이를 대리모로 하여 난관 내에 수정란을 이식한 후, 대리모로부터 얻은 자손 중 형질전환된 개체를 선별하는 과정으로 이루어진다.
- 이후 형질전환된 것으로 확인된 개체로부터 소변을 수거한 후, 목적단백질을 분리·정제 함으로써 유용단백질을 생산하게 된다.
- 본 발명의 유용단백질 생산방법에서, 분리·정제 방법은 통상적으로 사용되는 방법을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 여과법 또는 크로마토그래피법 등이 될 수 있다.
- 이렇게 하여 제조되는 본 발명의 형질전환동물은 방광 특이적으로 목적단백질을 발현하며, 기존의 방법에 비해 매우 높은 농도로 소변 중에 목적단백질을 발현한다.
- 스용> 그 예로, 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐의 경우, 0.5~1mg/ml 수준의 높은 EPO 발현율을 나타낸다. 원래 EPO는 태아의 조기 사망을 유발하기 때문에 발현시키기어려운 단백질임에도 불구하고, 기존의 유로플라킨 프로모터를 이용한 소변 중 단백질 발현율에 비해 1000배 이상의 높은 발현율을 나타낸다.
- 또한 본 발명의 형질전환동물로부터 생산된 단백질은 시판되는 동종 단백질이 나타내는 것 이상의 우수한 생리활성을 나타낸다.
- -60> 그 예로, 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEP0로 형질전환된 생쥐로부터 얻은 EP0는, EPO 의 존성 세포인 간세포주(hepatocyte cell line)의 생존율을 시판되는 EP0보다 높은 수준으로 유지시킨다.



- 마라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동물은 그간 대량생산하기가 어려웠던 유용단백질의 생산 분야에 유용하게 사용될 수 있다.
- 이하 본 발명을 하기 실시예에서 보다 상세하게 설명하되, 실시예에 의해 본 발명의 범위가 국한되는 것은 아니다.
- 53> [실시예 1] 본 발명의 돼지 유로플라킨 Ⅱ 프로모터의 분리
- 64> 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터를 분리하기 위해, 다음과 같이 실험을 수행하였다.
- 1) RT-PCR(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)에 의한 프로브 준비 대지의 유로플라킨 II 유전자의 염기서열이 공지되지 않았기 때문에, 염기서열이 공지된 생쥐와 소의 유로플라킨 II cDNA를 비교하여 두 종 간에 높은 상동성을 나타내면서 보존된 부분을 참조하여, 돼지 유로플라킨 II cDNA의 증폭에 사용될 디제너레이트 프라이머(degenerate primer)를 제조하였다. 정방향 프라이머의 염기서열은 서열번호 2, 역방향 프라이머의 염기서열은 서열번호 3에 각각 나타나 있다.
- 《67》 상기 프라이머를 이용하여, 돼지 방광의 전체 RNA(total RNA)에 대해 MuMLV 역전사효소를 사용하여 RT 반응을 수행하고, 그 결과 얻은 cDNA에 대해 Taq 중합효소를 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA는 염기서열 판독 결과, 유로플라킨 Ⅱ의 구조유전자 일부인 것으로 확인되었으며, pGEM T- easy 벡터를 사용하여 클로닝하였다.



유로플라킨 Ⅱ 프로모터를 분리하는데 사용될 프로브를 제조하기 위해, 상기에서 클로닝한 DNA 50ng을 3분간 끓인 후, 얼음에서 식혀 변성(denature)시켰다. 변성된 DNA를 프라이머, dNTP, [α-32P]dCTP(3000 Ci/nmol, NEN)를 함유하는 반응 완충액에 첨가한 후, 클레노우 효소 (Klenow fragment)를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 이렇게 하여 제조된 프로브는 유로플라킨 Ⅱ 구조유전자의 2번 엑손부터 5번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 A, 그리고 1번 엑손부터 2번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 B의 두 종류이다(도 1).

이후 반응액을 세파덱스 컬럼(Sephadex G-50 column)을 사용하여 정제함으로써, ³²P로 표지된 돼지 유로플라킨 II 프로모터 탐지용 DNA 프로브 A 및 프로브 B를 준비하였다.

- 70> 2) 라이브러리 스크리닝(Library Screening)
- 71> 돼지 유로플라킨 Ⅱ 프로모터를 분리하기 위해, 돼지의 게놈 라이브러리를 스크리닝하였다. 본 실시예에서 돼지의 게놈 라이브러리는 람다 픽스 Ⅱ 파지 벡터(lambda FixⅡ phage vector, Stratagene)에 삽입된 것을 사용하였다.
- <72> 라이브러리를 도입할 호스트 박테리아는 다음과 같이 준비하였다.
- 0.2%의 말토오스(maltose)가 함유된 LB 배지 5ml에 박테리아 콜로니 하나를 접종하여
 37℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 상기 배양액의 1%를 다시 새로운 0.2%의 말토오스 함유 LB
 배지 50ml로 옮겨, 2.5시간 동안 배양하였다. 600nm에서의 흡광도가 0.5 정도 되었을 때, 배양
 액을 2500rpm의 속도로 10분간 원심분리하였다. 그 결과 얻은 세포 침전물을 멸균한 10ml 황산
 마그네슘 용액에 현탁시켜, 최종농도가 1 × 1010세포/ml이 되도록 하고, 실험할 때까지 4℃에
 보관하였다.



- 라이브러리를 적정(titration)하기 위해, 라이브러리를 SM 용액에 여러 농도로 연속 회석(serial dilution)하였다. 고체 LB 배지가 담긴 플레이트(plate)를 37℃ 항온반응기 (incubator)에서 데우고, 탑 아가(top agar)를 녹여 48℃로 유지되는 수조에 놓아두었다. 여러 농도로 희석된 파지 용액 10ℓℓ 와 상기에서 준비한 호스트 박테리아 100ℓℓ 혼합하여, 37℃에서 호스트 박테리아를 감염(infection)시켰다.
- The Table 10 Table
- 상기 플레이트에 대해, 일련 번호를 기재한 NC 필터를 준비하고, 필터의 가운데 부분부터 당도록 하여 상기에서 준비한 라이브러리 DNA 플레이트 위에 필터를 덮었다. 필터에 바늘을 수직으로 찔러 위치를 표시하고, 1분 후 조심스럽게 필터를 배지로부터 떼어냈다.
- 각 필터를 변성화 용액(denaturation solution), 중성화 용액(neutralization solution)
 및 2 ※SC 용액에 차례로 1분씩 담근 후, 80℃ 오븐에서 2시간 동안 두어, 전이된 라이브러리
 DNA가 필터 상에 완전히 고정(immobilization)되도록 하였다.
- 지정된 필터를 2 ※SC 용액 상에 띄워 적신 후, 전혼성화 용액(prehybridization solution)이 들어 있는 페트리 디시(petri dish)에 하나씩 담그고, 68℃에서 1시간 동안 살살 흔들어 주면서 전혼성화 반응을 수행하였다. 전혼성화 반응 후, 상기 실시예 1의 1)에서 준비한 프로브를 첨가하고, 68℃에서 18시간 동안 살살 흔들어 혼성화 반응을 수행하였다. 혼성화 반응 후, 0.1% SDS를 함유하는 2 ※SC 용액에 필터를 담그고, 65℃에서 10분 동안 흔들면서 세



척하는 과정을 2번 반복하였다. 세척 후, 필터를 공기 중에서 건조시키고, 자기방사기록법 (autoradiography)을 수행하였다.

- 자기방사기록과 플레이트를 대조하여, 양성 반응을 보이는 플라그를 선택하고, 플라그를 SM 완충액 500㎡에 넣고 클로로포름(chloroform) 한 방울을 첨가한 후 잘 섞어 4℃에 보관하였다. 상기와 같은 스크리닝 과정을 세번 반복하여, 양성반응을 나타내는 클론들을 최종적으로 얻었다. 각 클론이 함유하는 DNA는 정제 키트(Qiagen lambda mini kit)를 이용하여 정제하였다
- DNA 염기서열의 판독은 ABI 377 DNA sequencer(Applied Biosystem)을 이용하였으며, 서 열판독결과는 CAP2 sequence assembly system을 사용하여 처리하고, 서열비교는 BLAST, SMART, PROSITE 등을, 그리고 모티프(motif) 분석은 Clustal W 프로그램을 사용하였다.
- 고 결과 프로브 A를 사용하여 스크리닝한 경우, 도 1의 클론 A 및 클론 B를 얻었으며, 프로브 B를 사용하여 스크리닝한 경우, 도 1의 클론 C 및 클론 D를 얻었다. 이들 클론은 각각 돼지 유로플라킨 Ⅱ 프로모터 또는 그 3' 방향으로 구조유전자를 포함하고 있으므로, 이들을 비교하여 돼지 유로플라킨 Ⅱ 프로모터의 완전한 염기서열을 얻었다.
- ※≥ 본 발명의 돼지 유로플라킨 Ⅱ 프로모터는 총 8847bp의 크기로, 그 염기서열은 서열번호 1에 나타나 있다.
- 83> 3) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 발현 양상 확인
 84> 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 발현 양상을 확인하기 위해, 돼지
 유로플라킨 II의 발현을 다음과 같이 확인하였다.



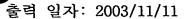
- 85> 3-1) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 방광 특이적 발현 확인
 86> 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질이 방광 특이적으로 발현됨을 노던 분
 - 석(Northern analysis)을 통해 확인하였다.
- 87> 상기 실시예 1의 2)에서 얻은 돼지 유로플라킨 II cDNA를 프로브로 하였으며, 이때 대조 군으로 모든 조직에서 일정하게 발현되는 액틴에 대한 프로브도 준비하였다. 상기 프로브들을 사용하여 여러 종류의 돼지 신체 조직에서 돼지 유로플라킨 II mRNA의 발현을 확인하기 위해, 방광, 심장, 간, 신장, 폐, 자궁 및 지라 등 의 조직에 대한 전체 RNA에 대해 다음과 같이 전 기영동을 수행하였다.
- 아가로스(agarose) 0.7g을 250ml 용량의 삼각 플라스크에 넣고 증류수 58 ml을 참가하여, 전자레인지에서 완전히 녹인 후 60℃로 유지되는 항온 수조에서 식혔다. 아가로스 젤의 온도가 60℃ 정도로 맞춰졌을 때, 10 ≫|동완충용액(running buffer) 7ml을 조심스럽게 흔들면서 첨가하고, 추가로 11.9ml의 포름알데히드(formaldehyde)를 첨가하여 1 ※포름알데히드 이동 젤 용액을 준비하였다. 미리 설치된 전기영동기구에 상기 용액을 붓고 20분 정도 방치하 여 젤을 제조하였다.
- 미세원침관에 RNA 6μl, 10 ≫이동완충용액 2.5μl, 포름알데히드 4μl, 포름아미드 (formamide) 12.5μl를 잘 혼합하여, 65℃에서 5분간 가열한 후 얼음 속에서 냉각시켰다. 상기시료에 젤 로딩 완충용액(gel-loading buffer) 2.5μl를 첨가하여 잘 혼합한 후, 50 V로 약 5분간 미리 전기영동시킨 젤에 로딩하여 1 ≫이동완충용액에서 120 V/cm로 전기영동을 시행하였다.



전기영동 후, 0.05 N 수산화나트륨 용액에 젤을 약 10분 정도 담가두어, 이후의 전이과정에서의 효율이 증진되도록 RNA를 부분 절단하였다.

- 90> 젤을 pH 7.5의 0.1 M 트리스 용액에 30분간 담가두고, 다시 20 ※SC 용액(3M 염화나트륨, 0.3M 염화시트레이트(sodium-citrate), pH 7.3)에 약 30분 가량 담가둔 후, 양이 온으로 하전된 멤브레인을 이용하여 RNA를 전이시켰다. 전이가 끝난 멤브레인은 RNA 고정을 위해 80℃에서 2시간 동안 두었다.
- 의> 멤브레인을 비닐 백에 넣고 멤브레인이 완전히 잠길 수 있는 최소 부피의 혼성화용액을 담은 후, 68℃의 진동 항온반응기에서(shaking incubator)에 1시간 이상 보관하였다. 이후, 용액을 빼내고 프로브가 함유된 혼성화용액 15㎖으로 교체하여 68℃의 진동 항온반응기에서 하룻밤 동안 방치하였다.
- 으> 혼성화 후, 상온에서 세척용액 1(2 ×SSC, 0.1% SDS)을 교체해가며 30분간 멤브레인을 세척하고, 이후 55℃에서 세척용액 2(0.2 ※SSC, 0.1% SDS)을 교체해가며 30분간 멤브레인을 세척하였다. 멤브레인을 상온에서 완전히 건조시킨 후, 자기방사기록법(autoradiography)을 수행하여 돼지 유로플라킨 Ⅱ mRNA의 발현 여부를 비교하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- <94> 따라서, 본 발명의 프로모터는 방광 특이적으로 단백질을 발현시킴을 알 수 있다.
- <95> 3-2) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 방광상피 특이적 발현 확인

- 한편 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질이 방광 조직 중 어느 세포에서 발현되는지를 확인하기 위해, 다음과 같이 면역조직염색을 수행하였다.
- 돼지 방광 조직의 파라핀 절편을 준비하여, 히스토클리어(Histoclear) 용액에 약 10분 동안 담가 파라핀을 제거하였다. 절편을 점차적으로 농도를 감소시키면서 알콜 수용액에 담가 탈수시킨 후, 3% 과산화수소를 함유하는 메탄올 및 0.1% 펩신을 함유하는 0.05N 염산(pH 2.25) 용액에 30분 동안 담가두어, 비특이적으로 염색되는 것을 미리 방지하였다.
- ◇8> 상기 절편을 TBS 완충액(0.05 M 트리스, pH 7.4, 0.85% 염화나트륨)을 이용하여 5분간 두번씩 세척한 후, 1:5의 비율로 일반 말 혈청을 희석한 TBS에서 블로킹(blocking) 반응을 수행하였다.
- 실로킹된 절편은 1:500의 비율로 1차 항체를 희석한 TBS에 하룻밤 동안 담가두었다. 이때 1차 항체로 돼지 유로플라킨 II 단백질에 특이적으로 결합할 수 있도록 제조된 다중클론항체(polyclonal antibody)를 사용하였으며, 음성 대조군으로 ABC 키트의 말혈청 1방울을 사용하였다.
- 1차 항체 반응을 수행한 절편을 TBS로 5분씩 2번 세척하여 과량의 항체를 제거한 후, 바이오틴(biotin)이 부착된 2차 항체와 30분간 반응시켰다. 이후 절편을 TBS로 5분간 3번 세척한후, ABC 시약과 30분간 반응시켰다. 다시 절편을 TBS로 세척하고, 1% 트리톤(Triton)-X 100을함유하는 PBS로 30초 헹구어 준 후, 0.5% DAB(diaminobenzidine) 및 0.01% 과산화수소를 함유하는 0.05M 트리스 완충액(pH 7.6)과 반응시켜 발색 반응을 수행하였다.
- 101> 발색 반응 후, 절편을 물로 세척하고 탈수시키고 마운팅한 후, 광학현미경 하에서 발색 된 부분을 관찰하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.





- 도 4a의 대조군에서는 어떠한 양성반응도 나타나지 않았으나, 도 4b에서 방광조직에 유
 로플라킨 Ⅱ 단백질에 대한 항체를 반응시킨 결과, 본 발명의 프로모터는 유로플라킨 Ⅱ 단백
 질을 돼지 방광상피에서만, 특히 상부기저세포의 세포질에서 특이적으로 발현되도록 조절하는
 것으로 나타났다.
- 3-3) 본 발명의 프로모터 조절 하에 발현되는 단백질의 발현율 확인
- 항광상피세포는 단백질 합성이 활발하게 일어나는 유선조직에 비해 상대적으로 단백질합성 능력이 낮은 것으로 알려져 있으므로, 본 발명의 프로모터 조절 하에 발현되는 단백질의실제 발현 수준을 레이저 스캐닝 세포분석(Laser scanning cytometry: 이하 'LSC'라 한다)을통해 다음과 같이 확인하였다.
- 05> 돼지 방광조직을 잘게 찢어, 1mg/ml 콜라게나제 타입 I (collagenase type I, Sigma), 0.51 mg/ml 히알루로니다제(hyaluronidase, Sigma), 50μg/ml 젠타마이신(gentamicin)을 함유하는 DMEM/F12 배지(Gibco)에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 분해반응을 수행하였다.
- PBS로 세척한 후, 60µm 나일론 망(Milipore)을 사용하여 큰 덩어리를 걸러내고, 현탁된 단일 세포들을 0.1% 젤라틴으로 코팅된 Lab-Tek 체임버 슬라이드(Nunc)에 부착시켰다. 슬라이드에 부착된 세포들을 차가운 PBS로 세척한 후, 차가운 메탄올로 15분간 고정시키고, 0.1% 트리톤-X 100 용액에 10분간 처리하였다.
- 고정된 세포들을 1% BSA를 함유하는 PBS 용액에서 1시간 동안 블로킹시키고, 상기 실시 예 1의 3-2)에서 제조한 유로플라킨 Ⅱ 다중클론항체를 1:100으로 희석한 용액에서 2시간 동안 실온반응시켰다. 세포들을 PBS로 세척한 후, FITC가 부착된 항-생쥐 IgG 2차 항체(Cappel

Laboratories)와 반응시켰다. 이때, 음성대조군으로서 2차 항체만 반응시킨 군도 함께 준비하였다.

108> 0.1% 트윈-20을 함유하는 PBS로 3번 세척한 후, 전체 세포수를 측정할 수 있도록 50μg/ml PI(propidium iodide)로 염색하였다. LSC 분석시 488mm의 아르곤 레이저로 형광을 방출시키고, FITC의 경우 530mm에서, PI의 경우 570nm 필터를 이용하여 각각의 형광 발현을 관찰하고 그 결과를 도 5에 나타내었다. 음성대조군에 대한 분석결과는 도 5a, 방광 세포 중 유로플라킨Ⅱ를 발현하는 세포에 대한 분석결과는 도 5b, 유로플라킨Ⅱ를 발현하는 방광세포의 면역표현형 분석은 도 5c에 각각 나타내었다.

도 5b에 나타난 바와 같이, 전체 방광세포의 8~14% 정도가 유로플라킨 Ⅱ를 발현하였으며, 도 5c에서 이들은 대부분 활발히 증식하고 분열하는 중인 우산세포임을 확인하였다. 일반적으로 소변 내의 단백질이 보통 5~25mg/ℓ의 매우 낮은 수준임을 감안할 때, 상기와 같은 수준의 유로플라킨 Ⅱ 발현율은 상당히 높은 것이며, 유선 조직을 이용했을 때보다 더 높은 효율로 단백질을 분리ㆍ정제할 수 있도록 할 것으로 추정된다.

(110) 따라서, 본 발명의 프로모터는 방광 내에서 우수한 효율로 목적단백질이 발현되도록 함을 알 수 있다.

111> [실시예 2] 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEP0의 제조

112> 상기 실시예 1에서 분리한 본 발명의 프로모터를 이용하여, 상기 프로모터의 조절 하에 EPO를 발현하는 벡터를 다음과 같이 제조하였다.



- 기본 골격 벡터로 pBluescript SK(-) 벡터를 정하여, 상기 실시예 1의 2)에서 분리한 본 발명의 프로모터를 삽입하였다. 그후 프로모터의 3'쪽에 인간 EPO를 암호화하는 유전자(서열 번호 4)를 삽입하였다.
- □ 그 결과 얻은 본 발명의 발현 벡터의 구조는 도 2에 나타나 있으며, 본 발명의 유로플라 킨 Ⅱ 프로모터의 조절 하에 EPO를 발현하게 된다. 상기 벡터를 pUP2/hEPO으로 명명하고, 2002년 10월 17일 한국 생명공학연구원 유전자은행에 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁하였다.
- 115 [실시예 3] 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEP0를 도입한 수정란의 제조
- 116 상기 실시예 2에서 제조한 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO를 도입한 수정란을 다음과 같이 제조하였다.
- (117) 1) 수정란의 채취
- 118 수정란을 채취하기 3일 전에 암컷 생쥐의 복강 내에 PMSG를 투여하고, 2일 후 오후 5시에 hCG를 투여한 후, 수컷 생쥐와 교배시켰다. 교배 다음날 오전 중에 암컷 생쥐에서 플러그 (plug)가 생성되었는지를 관찰하여 임신 여부를 확인하였다.
- 의신한 것으로 확인된 생쥐를 경추탈골시킨 후, 외과용 가위로 개복하여 자궁의 결합조 직부분을 분리하였다. 난관과 자궁 사이를 핀셋으로 찢은 후, 난소와 난관 사이를 가위로 자르고, 핀셋으로 찢은 부분의 자궁 쪽을 잘라 난관을 분리하였다.
- 분리한 난관을 M2 배지에 넣어 보온판 위에 올려놓고, 온도가 내려가는 것을
 방지하였다. 1ml 바늘을 이용하여 현미경 하에서 난관 팽대부를 터뜨려 배아(embryo)를 회수하



였다. 회수한 배아를 미리 실온에 꺼내둔 히알루로니다제 용액에 넣고, 난구세포가 떨어질 때까지 방치하였다.

M2 배지로 2~3 차례 세척한 후, 13000rpm에서 5분간 원심분리하고, 다시 M2 배지로 2
 ~3 차례 세척하여 정상란을 선별하였다. 선별된 수정란은 파라핀 오일로 도포된 M16 배지에서
 2~3 차례 세척한 후, 37℃ 항온반응기로 옮겨 보관해두었다.

22> 2) 수정란에 DNA 주입

23> 미세조작기(micromanipulator)를 이용하여, 상기 실시예 2-1)에서 채취한 수정란에 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEP0를 주입하였다.

[실시예 4] 본 발명의 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 생산하는 형질전환 생쥐의 제조

L25> 상기 실시예 3에서 제조한 수정란을 이용하여, 본 발명의 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 생산하는 형질전환 생쥐를 다음과 같이 제조하였다.

126> 1) 정관결찰 생쥐의 제조

127> 대리모를 위임신시키는데 사용할 정관결찰 생쥐는 다음과 같이 제조하였다.

128> 6주령의 수컷 ICR 생쥐를 선택하여 마취시킨 후, 핀셋과 가위로 치골에서부터 약 1.5cm 되는 상부의 외피를 정중선을 따라 약 1cm 가량 절개하였다. 절개구가 겹치지 않도록 오른쪽 또는 왼쪽으로 비켜서 근층을 절개하고, 음낭으로 내려와 있는 정소를 복강 내로 이동시켰다.

핀셋으로 정소, 정소상체 및 정관을 분리한 후, 정관 주변의 막을 핀셋으로 분리하여 달군 핀셋으로 정관을 끊어주었다. 정관이 분리된 것을 확인한 후, 근충을 봉합하고 마취가 깰 때까지 가온기에 두었다.

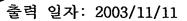
129 2) 위임신 대리모 생쥐의 제조

^{130>} 실험일 전에 발정이 확인된 ICR 암컷 생쥐를 상기 실시예 3-1)에서 제조한 정관결찰 생쥐와 교배시켰다. 실험일 오전에 암컷 생쥐에서 플러그가 생성되었는지를 관찰하여 위임신 여부를 확인하였다.

131> 3) 난관 내 이식

132> 상기 실시예 2의 2)에서 제조한 수정란을 이식용 피펫에 일렬로 배열하였다. 마취시킨 대리모 생쥐의 외피와 근충을 조금 절개하고, 홍채핀셋을 사용하여 난소, 난관 및 자궁각의 상 부를 체외로 끌어내었다. 난소낭을 통해 보이는 부분이 위로 가도록 난소의 위치를 잡고, 지혈 크렌메로 지방조직을 끼워 고정시켰다.

^{133>} 실체 현미경 하에서 난소낭의 막을 절개하고, 난관과 난소를 끌어당겨 난관체를 찾아, 이식용 피펫의 앞쪽 끝부분을 2~3mm 삽입하여 수정란을 배양액과 함께 난관 내로 조심스럽게 주입하였다. 피펫 내의 기포 두 개 중 마커로 하는 첫번째 기포가 난관 내에 삽입되는지 관찰하여 수정란이 확실히 주입되는 것을 확인하였다.





- 상기 대리모 생쥐로부터 자손을 얻고, 그 중 형질전환된 생쥐를 확인하기 위해, EPO의
 엑손 1과 엑손 2를 프로브로 사용하여 노던 분석을 수행한 결과, 76마리의 생쥐 중 12마리가
 형질전환된 것으로 확인되었다.
- 5 형질전환 생쥐에 대해, EPO 단백질의 발현 양상을 확인한 결과, 예상한 바와 같이 EPO 단백질은 방광 특이적으로 발현됨을 알 수 있었다(도 6).
- ≫ [실시예 5] 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 인간 EPO의 생산
- 37> 1) 본 발명의 형질전환 생쥐의 소변 중의 EPO 발현율 확인
- 본 발명의 형질전환 생쥐의 소변 중의 EPO 발현율을 확인하기 위해, 형질전환 생쥐로부터 소변을 얻어 여과한 후, HPLC 분석을 수행하였다. 각 분획의 단백질 성분을 조사하기 위해, 전기영동 및 웨스턴 분석을 수행하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- 39> 도 7a의 전기영동결과 및 도 7b의 웨스턴 분석결과에 나타난 바와 같이, 본 발명의 형질 전환 생쥐로부터 얻은 소변 중에는 EPO가 높은 농도로 존재하였다.
- 40> 소변 중의 EPO 농도를 수치화한 결과, 0.5~1mg/ml 수준인 것으로 나타났는데, 이러한 발현율은 기존의 형질전환동물에서 볼 수 있는 우유 중의 단백질 발현율에 비해 현저하게 높은 것이다.
- 나 따라서, 본 발명의 프로모터를 이용하여 제조한 형질전환동물은 우수한 효율로 소변 중에 목적 단백질을 생산하게 할 수 있다.
- 142> 2) 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 얻은 EPO의 생리활성 확인

^{43>} 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 얻은 EPO의 생리활성을 확인하기 위해, 실시예 3의 1)에 서 얻은 EPO를 EPO 의존성인 간세포에 첨가하고 배양하였다. 이때, 비교군에는 시판 중인 EPO 를 첨가하였다. 배양한 지 24, 48, 72 시간별로 세포의 생존율을 측정하여, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

.44> 【丑 1】

148>

배양시간	DMEM/F12(%)	FBS	FBS+시판 EPO	FBS+본 발명의 EPO
24	38.5 ±6.8	54.9 ±4.3	58.2 ±6.6	72.1 ±4.7
48	21.6 #.4	39.9 ±2.9	50.0 ±2.4	60.4 #7.5
72	10.0 ±4.6	20.8 ±1.7	39.6 ±3.8	53.9 ±4.0

표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 형질전환 생쥐의 소변에서 분리한 EPO는 모든 시간 대에 있어서, 시판 중인 EPO보다 더 높은 생리활성을 나타내는 것으로 관찰되었다.

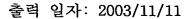
146> 따라서, 본 발명의 프로모터를 이용하여 제조한 형질전환동물을 통해, 기존의 방법으로 얻을 수 있는 단백질보다 훨씬 우수한 생리활성을 나타내는 단백질을 얻을 수 있다.

147> [실시예 6] 조절인자들을 포함하는 본 발명의 발현 벡터의 제조 및 효율성 확인

1) 조절인자들을 포함하는 본 발명의 발현 벡터의 제조

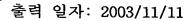
본 발명의 UPII 프로모터의 조절 하에 EPO 생산을 극대화할 수 있는 벡터 시스템을 확립하기 위해, pUP2/hEPO 벡터에 선택적 표지 유전자 및 조절인자를 도입하여 다음과 같이 일련의 개량된 벡터들을 제조하였다.

150> 1-1) pUPII/hEPO-Neo 벡터의 제조





- UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 발현할 수 있는 세포주(cell line) 구축시 효율적인 선택적 표지 유전자를 벡터 내에 삽입하기 위해, 네오마이신 저항성 유전자를 다음과 같이 pUP2/hEP0 벡터에 도입하여 pUP2/hEP0-Neo 벡터를 제조하였다.
- ▷ 네오마이신 저항성 유전자를 얻기 위해 pEGFP-N1 벡터(Clontech)를 주형으로 하고, 정방향 프라이머(서열번호 8)와 역방향 프라이머(서열번호 9)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다.
- ≫ 서열번호 8: 5' GCGGCCGCGCGCGTCAGGTGGCAC 3'
- 34> 서열번호 9: 5' CGATCGGACGCTCAGTGGAACGAAAACTC 3'
- 55> 그 결과 얻은 1.9 Kb의 PCR 산물을 pGEM T-easy 벡터에 삽입한 후 Not I 제한효소로 절단하여, 클로닝에 사용할 네오마이신 저항성 유전자 부분을 준비하였다.
- 56> 본 발명의 pUP2/hEPO 벡터의 암피실린 저항성 유전자(ampicillin-resistance gene) 부위 를 NotI과 Sall 제한효소로 절단하여 제거함으로써, 클로닝에 사용할 벡터를 준비하였다.
- .57> 상기와 같이 준비한 네오마이신 저항성 유전자와 벡터를 연결하여, 네오마이신 저항성 유전자가 기존의 pUP2/hEPO vector에 삽입된 pUP2/hEPO-Neo 벡터를 제조하였다.
- 1-2) I/pUP2/hEPO 벡터의 제조
- UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 안정적으로 발현할 수 있는 발현 벡터를 얻기 위해 , 인슐레이터 유전자를 다음과 같이 pUP2/hEPO-Neo 벡터에 도입하여 I/pUP2/hEPO 벡터를 제조하였다.
- 160> 인슐레이터 유전자는 닭(chicken)의 B-글로빈 유전자(B-globin) 인슐레이터 유전자가 포함되어 있는 pBC1 벡터(Invitrogen)를 주형으로 하고, 정방향 프라이머(서열번호 10)와 역방향





프라이머(서열번호 11)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였으며, PCR 효율을 높이기 위해 2 카피(copy)를 증폭하였다.

- .61> 서열번호 10: 5' TCGACTCTAGAGGGACAG 3'
- .62> 서열번호 11: 5' CTCACTGACTCCGTTCCT 3'
- 163> 그 결과 얻은 2.4Kb의 PCR 산물을 pGEM T-easy 벡터에 삽입한 후 Not I 제한효소로 절단하여, 클로닝에 사용할 인슐레이터 유전자 부분을 준비하였다.
- ^{164>} 상기와 같이 준비한 인슐레이터 유전자와 1-1)의 벡터를 NotI site로 연결하여, I/pUP2/hEPO 벡터(도 8)를 제조하였다.
- 165> 1-3) pUP2/hEPO(WPRE) 벡터의 제조
- UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 대량으로 발현할 수 있는 발현 벡터를 얻기 위해,
 WPRE 유전자를 다음과 같이 pUP2/hEPO-Neo 벡터에 도입하여 pUP2/hEPO(WPRE) 벡터를 제조하였다.
- 167> WPRE 유전자를 클로닝하기 위해 정방향 프라이머(서열번호 12)와 역방향 프라이머(서열번호 13)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다.
- 168> 서열번호 12: 5' ACCAGGTTCTGTTCCTGTTAATCAACCTC 3'
- 169> 서열번호 13: 5' CTCGAGGAGCCCGAGGCGAAACAGGCG 3'
- 그 결과 얻은 0.6 Kb의 PCR 산물을 pGEM T-easy 벡터에 삽입한 후, 상기 실시예 2)에서 얻은 pUP2/hEPO-Neo의 NcoI 제한효소 위치에 다시 삽입하였다. 상기 벡터를 BspHI 제한효소로 절단하여 클로닝에 사용할 WPRE 유전자 부분을 준비하였다.

- 7> 한편 본 발명의 pUP2/hEPO 벡터의 EPO 유전자 뒤쪽을 NcoI 제한효소로 절단하여 클로닝에 사용할 벡터를 준비하였다.
- 7▷ 상기와 같이 준비한 ₩PRE 유전자와 벡터를 연결하여, pUP2/hEPO(₩PRE) 벡터(도 9)를 제조하였다.
- .73> 1-4) I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터의 제조
- 74> UPII 프로모터의 조절 하에 발현량의 극대화, 발현의 안정화 및 효율적인 세포주 구축을 모두 충족시킬 수 있는 발현 벡터를 얻기 위해, 다음과 같이 I/pUP2 /hEPO(WPRE) 벡터를 제조하였다.
- 년 생기와 같이 1-2)에서 준비한 인슐레이터 유전자와 1-3)의 벡터를 NotI site로 연결하여I/pUP2/hEPO 벡터(도 10)를 제조하였다.
- 176> 2) 본 발명의 발현 벡터들의 효율성 확인
- 177> 상기 실시예 6에서 제조한 발현 벡터들의 효율성을 다음과 같이 확인하였다.
- 178> 2-1) 본 발명의 발현 벡터들에 대한 PCR 분석
- 179> 본 발명의 발현 벡터들에 의한 EPO 유전자의 발현량을 확인하기 위해, 다음과 같이 실시 간 PCR(real-time PCR)을 수행하였다.
- 180> 상기 실시예 6에서 제조한 본 발명의 발현 벡터 4종류를 형질도입키트(transfection Kit, Effectene, Qiagen)를 이용하여 방광 세포주 RT4에 도입한 후 계대배양을 거쳐 안정된 세



포라인(stable cell line)을 구축하였다.각 세포주로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 추출하여 PCR을 수행함으로써 형질도입 이 제대로 이루어졌음을 확인하였다.

- EPO 유전자의 발현량을 확인하기 위해 4종류의 세포로부터 Total RNA를 뽑은 후 RT-PCR을 하여 cDNA를 증폭하였다. 상기 cDNA를 주형으로 하고 EPO의 엑손 부분을 증폭할수 있는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.
- ** 각각의 세포에서 발현량을 확인하기 위해 세포 내에서 일정량으로 발현되는 유전자 (house keeping gene)인 GAPDH를 대조군으로 사용하여 3차례의 반복실험을 함께 수행하였으며, 결과는 통계프로그램인 SAS를 이용하여 통계처리하고 도 11에 나타내었다(pUP2: pUP2/hEP0 벡터, IUP2:I/pUP2/hEP0 벡터, PW:pUP2/hEP0(WPRE) 벡터, IW:I/pUP2/hEP0(WPRE) 벡터).
- E 11에 나타난 바와 같이, 본 발명의 발현 벡터들은 pUP2/hEPO 벡터, I/pUP2/hEPO 벡터, pUP2/hEPO(WPRE) 벡터, pUP2/hEPO(WPRE) 벡터의 순으로 높은 EPO 유전자 발현율을 보였다.
- 184> 특히 WPRE와 인슐레이터를 함께 포함하는 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터는 별도의 조절인자를 포함하지 않는 pUP2/hEPO 벡터에 비해 50배 정도 높은 발현율을 나타내었다(도 11b).
- 185> 따라서 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터를 비롯한 본 발명의 발현 벡터들은 EPO의 생산에 유용하 게 사용될 수 있다.
- 186> 2-2) 본 발명의 발현 벡터들에 대한 웨스턴 분석
- :187> 본 발명의 발현 벡터들에 의한 EPO 단백질의 발현량을 확인하기 위해, 다음과 같이 웨스턴 분석을 수행하였다.



- 》 상기 실시예 6의 2-1)에서 본 발명의 발현 벡터들을 각각 도입하여 구축한 세포주들을, NP-40이 포함된 용해 완충액(lysis buffer)에 넣고 초음파 처리하여 단백질을 추출하였다.
- 89> 각각 40μg의 단백질을 SDS-PAGE 젤에 전기영동하여 PVDF 막으로 전이시킨 후, EPO 항체를 처리하여 EPO 단백질 발현량을 확인하였다. EPO 단백질의 발현량을 정량하기 위해, 액틴 (Actin)에 대한 항체를 대조군으로 사용하게 2차례의 반복실험을 함께 수행하였다. 결과는 통계프로그램인 SAS를 이용하여 통계처리하고 도 11에 나타내었다(pUP2: pUP2/hEPO 벡터, IUP2:I/pUP2/hEPO 벡터, PW:pUP2/hEPO(WPRE) 벡터, IW:I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터).
- 90> 도 12에 나타난 바와 같이, 본 발명의 발현 벡터들은 pUP2/hEPO 벡터, I/pUP2/hEPO 벡터, pUP2/hEPO(WPRE) 벡터, pUP2/hEPO(WPRE) 벡터의 순으로 높은 EPO 단백질 발현율을 보였다.
- 191> 이러한 결과는 상기 실시예 7의 1)에서 나타난 결과와 일치하는 것이다.
- 192> 따라서 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터를 비롯한 본 발명의 발현 벡터들은 EPO의 생산에 유용하 게 사용될 수 있다.

【발명의 효과】

- 193> 본 발명의 프로모터는 방광 특이적인 목적단백질 발현을 유도하며, 기존의 방법에 비해 매우 높은 농도로 소변 중에 목적단백질을 발현한다.
- 194> 본 발명의 프로모터 및 그 조절을 받는 목적단백질로 이루어진 발현 벡터로 형질전환된 동물은 기존의 형질전환동물에 비해 훨씬 높은 효율로 소변 중에 목적단백질을 분비한다. 또한 본 발명의 형질전환동물로부터 얻은 단백질은 기존의 동종 단백질이 나타내는 것 이상의 우수한 생리활성을 나타낸다.

107077256

출력 일자: 2003/11/11

파라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동물은 의약학적으로 중요한 가치를 지닌 유용단백질의 생산 분야에 유용하게 사용될 수 있다.



【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 1의 구조를 갖는 돼지의 유로플라킨 Ⅱ 유전자의 프로모터

<서열번호 1>

gggctaggagtggaatcagagctggcctatgccacagcaacgcagaatccaaaccacatctccgacctacaccagaccgtca ccataacacaggatccttaacccactgagcaaggtcagggatcaaacccaaatcctcatggatactagtcgggttcttaacccgctga gccacagtgggcactcctgtttttgtttgtgtcttcgttttttggctgcatctgcagcatacagaagttcctgggttaaggattgaac ccatgccacagcagcaacccgagccacagcagtgacaacagcctgatccttaactgctagaccaccagggaacgcccctcaactttt atgtggagattcgcaggctanaggtctaatcggagctgtagccaccggcctacaccagagccatagcaacgagggatccgagccgagt $\verb|ctgcaacctacactacagctcatggcaacaccggatcgttaacccactgagcaaggccaggggatcgaacccgcaacctcatggttcc||$ tagtcagattcgttaaccactgcaccatgacaggaactcccaacctgacaattttatcatttctgcaccctagttgttgagtaatttg aaaaattcccaagatgtcaaggtcagtgtgatggttaattttatgtgtcaacctgactaggccatgttgcccggatgtggagtcattg catcagaaacaaatccgactaggaaacaagcggttgcaggttcgatccctggcctcacttagtggagtcaggatctggcgttgccgtg ${\tt agctgtggtacaggtggcagatgcagctcggatctagcattgctgtggctgtggtgtaggccagcagctgtagctctgattaaacccc}$ tgagaaggaaagaattetgeeaaaagaeegeettnggaentaaaetgeaaetettteetgagttteeageatgttggeeteeeeate



aaaagtataagctttctctgcaccactgccccattcttctctctgcagacagggtcattcctaaagccaaacgctaatgcctccacct a atggaag acag ccttcccgttgtggtgcagcggaaacagtggtgccttggaagcgctgggacgcaggttcgacccctggcccagcatagtaggttaaggatccagtgttgccacagttttggcttagattgaaactgcagctcagatctggtccctggcctgggaacttcatacg tctctctttcccttcccagccaagctctgcaaagagcggtctgcacagttctaactctacctccccagttggccctggactttctcagtctggcttctaccccctcacccgtaggaatctgctctgaaggacacgcacccctcacgatccttggcccagggacattttttgta cattccgccttcttcagcccctccttcatctgtcctttagatgccgcatttcctagtatcctgtcctgcgcggnctcgtccttccc $ttc caca a ctctctt caaggactcttttctccat {\tt gtgcgattttgcccatggcccaccttccctcttttacccagactttcccccgg}$ tgctccagactcatagactcaattatgaaaacatagttttcatctgatttgcccaagatatttgcattagttattactgtataacagcgcactgaaaatgtccccctgggctaatcatacggaggactgacc



agggctggaggatctgttccaagctcattcattcacatggccgtaggttggagacagctcttctctggatcttggcaggagcctcaattccttgtcacgtggacctccccttggaggggtcccatgtcctccatggtgagtaatccatgagagcaaggtggaaggtgccatgttt aggacct agcct caggagggacct acgt cact tct gtt gt agt ct gtt ggccaca cagacta accct gacaca at gcacccat ccc and to get the second secat gacct gct gcc a gtccattctccacact gtttcca gaat gat atttacat a a gta aa actcctca a a ggctttt gag atttttttcaccctgccagtggctagaactctcaccatgtccatccttgaatactgctttctagccaagagctattgtttgcagttcccagaatgtttcccagg ttagccat caa attg gaattg tagctg ctg gcctacaccacagccatag caacaccagacccaag tcacatctg caacctcattaccactgagccacaacaggaactcctctctttttatggtcacacctgcagcatatggaagttcctgggccagggattgaatct gagtggcagctgtgacaatgccgtatcctttaattcactgtgctgggctgaggggntaaantgcccctcctaaaaaacctgagctgct gcagttggattcttaatccactgcaccacaagggggaaggtcaagaactgtcttgccatctctgtatcttatcacctagcatagtacc gactagcattcataagaacttgggttcgatccctagcctcagtgggttaaggatgcagcattgctgtgagctgtggtgtaggtcgcag gtggtatacaagtaacagctgatccatgtctcagtcatgtttcc



 $\tt gctctgtggccttgggaaagctatttattgcctctgagcctctaattttcatctgcaccaaggattaataaaaaggaggataagataatttattgcctctgagcctctaattttcatctgcaccaaggattaataaaaaaggaggataagatagat$ tgagacagatttttttttttcttttatggttgcacgtgcaacatatggaagttcctgggctggggtcgaattggagctgcaggtgcttgcctatgccacagccatggcaacatcatatacaaaccgcacctgtgacctacaccacagattgcagcaacgctggatccttcacccaa ggagcaaggccaggaatcaaatgtgcatcctcacaaacactatgtccggtttttaacccgctgagccacaccaggaactccatggcga a agatttggggcaagtggtgatatcatggcagcattagaaaaaataaagaagcatccacttgttttccaacactgaacaactgagattt caa agt gact caccaa aagt cat at agcat cact cct caa caggagga cag cagt ccc caccagagggt aa cat gt ccat ggag cct and a cat geometric contract contragtggacacatttttctaactgactgggaagcagcagagtggtattgtgaagggggaatcataggtatatcaaacagacttaggttctcccttatggctcagcaggttaaggatctggtattgtcactgctg



gagccagtgttgctggtcaaaaaagaaaagaaaaagtaccatagttagagtaaatctgttttaggagctattctttggggcagaacag agagat caggagct ccttg agagcagaa actt accttt a catccctcgtgcct agcacggttct aggggcat acctggt attt aataagcctagaaagagtaggtccaagaaagagatcccaggcatttgtggccctggttccctttttccaagccatgaggaaatcctcagagga cccctctctctagctcccaaacccttctcggctgctgtgatgggataattagatgcgagagctcagcacagatgatgctccagttg $\verb|cctcttaaaatctggtcagagctctgccctcccctactctgtcccactcataatttcagatggagttgggggcttaggagtgg|$ a agtgta a a can cnt cct gggtt gg caat ggg at ctg a ag agt a cta ag at ccct cag acct gg a at tcc accatt t agt ctt t ccct against a consideration of the contraction of the contractionctctccaaagttctcaatgtgcaaaagatcctctttcagtttgcagagcaatgataggatcttctaaaaggagacaaaagccaaggtg caggaaaaatagaattcagttcttcacccaaaggcagcctgtcctgggagacaggggtgaaacacttggtcctgatctccatcagagg tccctcatgattcatacgcacattaaatttggagaagcgctgac



gca at gt gg gat ct gag cca cgt ct gca acct a cacca cag gca acca cag at cct ta accca ct gag caa gg gca gg gat considerable and the considerable gradient of thegagcccacgtcctcatggatgctagttgggttcgttaaccgctgagccatgatgataactcctctttctattctttagtcacaaacag ${\sf tcaacaaaggttgctgaccaaggctgatcgtgcccacccccagcccccagactgggccagtgcccaccccttgggtctctctggaa}$ atcctgcccagcatcaattggctccactctccaggaggatgggaagccctgtggcccctgggactcacacccctctgcatctcccaga gtgcaggacctggtcttcaggagacaccaagaactggctccccggctctgctgccccacccctactaccagtttctctcccattc ggaagaagggggttttccacccccgctttagtcaccctgcccctctgcagctgcctgagccaccaagacccagccaaggtctcctgc tgtagggcccaaggggcaggttgaacaggattcccctctggcccctcctacccccaggacaaaaccagagccccaggacagggcctca cttgcctcaggaaaccacagcttgccagcacccagcccagcaccagcccagct



【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열에 하나 이상의 붕괴, 결실, 삽입, 점, 치환, 논센스, 미스센스, 다형현상, 재배열 돌연변이가 일어난 기능적 등가물 중 선택된 하나임을 특징으로 하는 유로플라킨 II 프로모터

【청구항 3】

제 1항 또는 제 2항의 프로모터 염기서열 및 그 3' 쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염 기서열을 포함함을 특징으로 하는 발현 벡터

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 목적단백질은 인간 EPO(erythropoietin)임을 특징으로 하는 발현 벡터

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁된 발현 벡터 pUP2/hEP0

【청구항 6】

제 4항에 있어서, 선택적 표지 유전자(selective marker)로 서열번호 5의 네오마이신 저항성 유전자(neomycin-resistant gene)를 포함하며, UP2 프로모터의 5'쪽에 서열번호 6의 인슐레이터(insulator)를 포함함을 특징으로 하는 I/pUP2/hEPO 벡터

<서열번호 5>



atg caa agc atg catct caatta g t cag caac cag g t g t g g aa ag t ccc cag g ct ccc cag cag g cag aag t atg caa ag cat g catcal g g catcatcaattagtcag caaccatagtcccgcccctaactccgcccatcccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgccccatgg $\verb|ctaggcttttgcaaagatcgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggcc||$ gcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcagg $\verb|ctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacct| \\$ $\verb|gatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatc| \\$ cgcccaacctgccatcacgagatttcgattccaccgccgccttctatgaaaggttgggcttcggaatcgttttccgggacgccggctggttgggcttcggaatcgttttccgggacgccggctgggacgccggctgggacgccggctgggacgccggctgggacgccggctgggacgccggctgggacgccggctgggacgccggctgggacgccggctgggacgccggctgggacgccggctgggacgccggcctggaatcgaatcgaatgatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagttcttcgcccaccctagggggaggctaactgaaacacggaaggagacaataccg gaaggaacccgcgctatgacggcaataaaaagacagaataaaacgcacggtgttgggtcgtttgttcataaacgcggggttcggtcccttcgggtgaaggcccagggctcgcagccaacgtcggggcggcag



<서열번호 7>

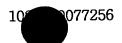
tcgactctagagggacagccccccaaagcccccagggatgta attacgtccctcccccgctaggggcagcagcagccgagatttagaatgacagaatcatagaacggcctgggttgcaaaggagcacagtgctcatccagatccaaccccctgctatgtgcagggtcat caac cag cag cag cag ag cacat ccag cct g g cct t g a at g cct g cag g g at g g g g cat cca cag cct cct t g g g cat can be a considered for the constant of the constantagatcttggggataaggaagtgcaggacagcatggacgtgggacatgcaggtgttgagggctctgggacactctccaagtcacagcgt tcagaacagccttaaggataagaagataggatagaaggacaaagagcaagttaaaacccagcatggagaggagcacaaaaaggccaca gacactgctggtccctgtgtctgagcctgcatgtttgatggtgtctggatgcaagcagaagggtggaagagcttgcctggagagata cagctgggtcagtaggactgggacaggcagctggagaattgccatgtagatgttcatacaatcgtcaaatcatgaaggctggaaagcc tccaagatccccaagaccaaccccaacccaccgtgcccactggccatgtccctcagtgccacatccccacagttcttcatcacc t ccagggacggt gacccccccacctccgt gggcagct gt gccact gcagcaccgct ctt t ggagaaggt aa at ctt gct aa at ccagc ccccccaaagcccccagggatgtaattacgtccctccccgctaggggcagcagcagcgagccgcccggggctccgctccggtccggcg agagccacatccagcctggccttgaatgcctgcagggatggggcatccacagcctccttgggcaacctgttcagtgcgtcaccaccct ctgggggaaaaactgcctcctcatatccaacccaaacctccctgtctcagtgtaaagccattcccccttgtcctatcaagggggagt



ttgctgtgacattgttggtctggggtgacacatgtttgccaattcagtgcatcacggagaggcagatcttggggataaggaagtgcag
gacagcatggacgtgggacatgcaggtgttgagggctctgggacactctccaagtcacagcgttcagaacagccttaaggataagaag
ataggatagaaggacaaaggacaagttaaaacccagcatggagaggagcacaaaaaaggccacagacactgctggtccctgtgtctgag
cctgcatgtttgatggtgtctggatgcaagcagaaggggtccatgtccctcagtgccacatccccacagttcttcatcacctccaggg
acggtgacccccccacctccgtgggcagctgtgccactgcagcaccgctctttggagaaggtaaatcttgctaaatccagcccgaccc
tcccctggcacaacgtaaggccattatctctcatccaactccaggaacggagtcagtgag

【청구항 7】

제 4항에 있어서, 선택적 표지 유전자로 서열번호 5의 네오마이신 저항성 유전자를 포함하며, EPO 유전자의 3' 쪽에 서열번호 7의 WPRE(woodchuck hepatitus virus posttranscriptional regulatory element)를 포함함을 특징으로 하는 pUP2/hEPO(WPRE) 벡터 <서열번호 7>



【청구항 8】

제 4항에 있어서, 선택적 표지 유전자로 서열번호 5의 네오마이신 저항성 유전자를 포함하며, UP2 프로모터의 5'쪽에 서열번호 6의 인슐레이터를 포함하고, EPO 유전자의 3'쪽에서열번호 7의 WPRE를 포함함을 특징으로 하는 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터

【청구항 9】

제 3항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 도입시킨 동물 수정란

【청구항 10】

제 9항의 수정란을 이식시켜 얻음을 특징으로 하는 형질전환동물

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 돼지, 생쥐, 소, 닭, 양 또는 염소 중 선택된 하나임을 특징으로 하는 형질전환동물

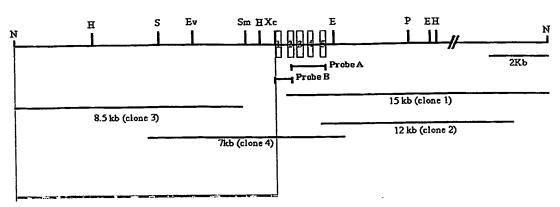
【청구항 12】

제 3항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 도입시킨 동물 수정란을 대리모 동물에 이식하고, 상기 대리모 동물로부터 형질전환동물을 얻고, 상기 형질전환동물의 소변으로부터 유용단백질을 분리·정제하는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 유용단백질의 제조 방법



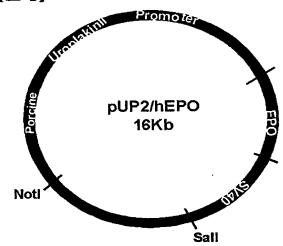
【도면】

[도 1]



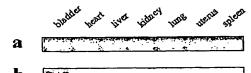
Porcine UPII promoter: 8847kb

[도 2]



pUP2/hEPO Expression Vector

[도 3]





[도 4]

a

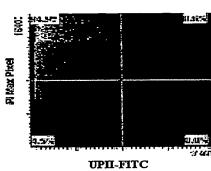


b

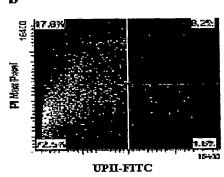


[도 5]

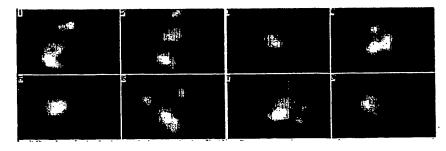
a

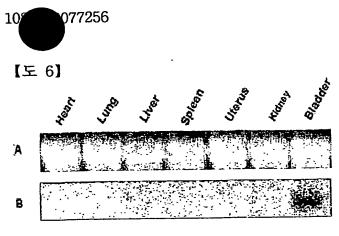


b

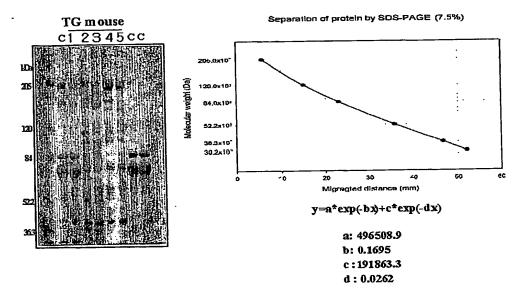


c





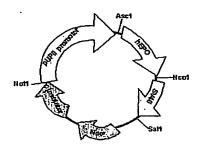
[도 7] a



b C 1 2 3 4 5 C



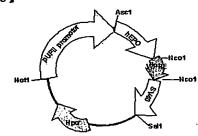
[도 8]





I/pUPII/hEPO (IUP2)

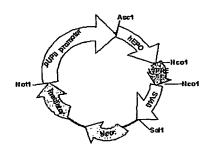






pUPII/hEPO/WPRE (PW)

[도 10]

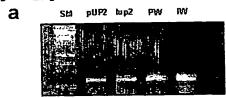




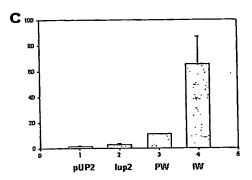
I/pUPII/hEPO/WPRE (IW)



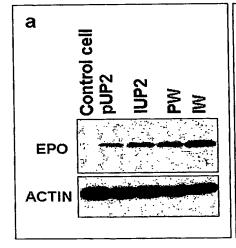
[도 11]

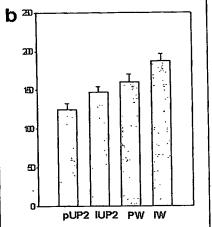


b _		
_	pUP2	1.33±0.47
	iUP2	2.35±1.9
	PW	11.06±0.06
	DAT	65.49±21.71



[도 12]





【서열목록】

<110> CHO-A PHARM CO., LTD.

KIM, Jin Hoi <120> Por

Porcine uroplakin II

promoter and the production method of useful

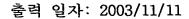
proteins using said promoter <

130> 03P-142 <150>

PCT/KR 1020020067856 <151>

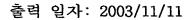
2002-11-04 <160>

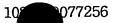
13 <170>



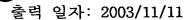


DNA <213> Sus scrofa <220> 8847 <212> Kopatent In 1.71 <210> 1 <211> porcine uroplakin II promoter <400> (1)..(8847) <223> promoter <222> <221> 1 gggctaggag tggaatcaga gctggcctat gccacagcaa cgcagaatcc aaaccacatc 60 tecgaectae accagaecgt caccataaca caggatectt aacceaetga geaaggteag 120 180 ggatcaaacc caaatcctca tggatactag tcgggttctt aacccgctga gccacagtgg gcactcctgt ttttgtttgt gtcttcgttt tttggctgca tctgcagcat acagaagttc 240 300 ctgggttaag gattgaaccc atgccacagc agcaacccga gccacagcag tgacaacagc ctgatcctta actgctagac caccagggaa cgcccctca acttttcatg ccttggaaac 360 cctgagtcag tacaacctga caatngnttt ttttttttt ttttttgcc ttttctaggg 420 480 ccacttcccg cggcatgtgg agattcgcag gctanaggtc taatcggagc tgtagccacc 540 ggcctacacc agagccatag caacgaggga tccgagccga gtctgcaacc tacactacag ctcatggcaa caccggatcg ttaacccact gagcaaggcc aggggatcga acccgcaacc 600 660 tcatggttcc tagtcagatt cgttaaccac tgcaccatga caggaactcc caacctgaca 720 attttatcat ttctgcaccc tagttgttga gtaatttgaa aaattcccaa gatgtcaagg tcagtgtgat ggttaatttt atgtgtcaac ctgactaggc catgttgccc ggatgtggag 780 840 tcattgttat tctggatgtt actgtgaaga tatgttttgg atgaaattaa catttaaatc 900 agtgggggga aaaaaagaag ttctcgttct ggtgcatcag aaacaaatcc gactaggaaa 960 caagcggttg caggttcgat ccctggcctc acttagtgga gtcaggatct ggcgttgccg 1020 tgagctgtgg tacaggtggc agatgcagct cggatctagc attgctgtgg ctgtggtgta 1080 ggccagcagc tgtagctctg attaaacccc aagtctggga acctccatat gccgtgggtg 1140 tggcccgaaa aagcaaaaaa taaataaata aataaattta aaccagggga ttttgagcaa



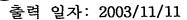


agcagattac	cccataatat	gggtgggtct	catcaagttc	attgtaggcc	ctagtggaac	1200
aaagaccgac	ctccaccttc	tccccatgag	aaggaaagaa	ttctgccaaa	agaccgcctt	1260
nggacntaaa	ctgcaactct	ttcctgagtt	tccagcatgt	tggcctcccc	catcagactt	1320
tggacttgcc	aagcctccgc	aattgcatga	gccaattcct	taaaataaat	ccgtctatat	1380
atacacatcc	tgttggttct	gtttctccag	agaaccctga	ctaacgcagt	ctgcacccct	1440
gaagaccagt	ggtccccaca	ctcagctggg	tgtcacctcc	aaacactcag	ccttcctcaa	1500
ggctctttct	agctgtgtcc	tcctctcccc	acaacagctg	tttcaaactc	tcacccctct	1560
tcagggcgca	atcccttctc	ctccctgagt	ttcctacttc	ccagagaaag	cagagacctt	1620
caggagtgtg	ctgccttaac	ttacttcctt	catccctcag	ccttgcaaaa	gtataagctt	1680
tctctgcacc	actgccccat	tcttctctct	gcagacaggg	tcattcctaa	agccaaacgc	1740
taatgcctcc	acctctgatc	tgagtcccat	cttttccctc	ctccagaagc	ttcctcataa	1800
attctacccc	cttttcttcc	ttatctttat	ctttgaaaaa	: aaaatggaag	acagccttcc	1860
cgttgtggtg	g cagcggaaac	agtggtgcct	tggaagcgct	gggacgcagg	ttcgacccct	1920
ggcccagcat	agtaggttaa	ggatccagtg	ttgccacagt	tttggcttag	attgaaactg	1980
cagctcagat	ctggtccctg	gcctgggaac	: ttcatacgc	cacaggacggo	ccaaaaagaa	2040
aagaaagaaa	a aaataaaaaa	a caaaacagaa	aagcctttc	c tgtacccca	attccctcca	2100
gttatctctc	c tctttccctt	cccagccaag	g ctctgcaaag	g agcggtctgo	cacagttctaa	2160
ctctacctc	c tcccagttgg	g ccctggactt	tctcagtct	g gcttctacco	ccctcacccg	2220
taggaatct	g ctctgaagga	a cacgcaccco	ctcacgatcc	t tggcccaggg	g acatttttg	2280
taccagcct	t tcaatcctg	a ccttcatato	c atccgacac	c tcctttgtga	a aaccctccat	2340
ccactttct	c ctggttccc	c tectaagae	catteegee	t tcttcagcc	cctccctcca	2400



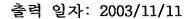


	0.400
tctgtccttt agatgccgca tttcctagta tcctgtcctg	2460
ccacaactct cttcaaggac tcttttctcc atgtgcgatt ttgcccatgg cccaccttcc	2520
ctctctttac ccagactttc ccccggtgct ccagactcat agactcaatt atgaaaacat	2580
agttttcatc tgatttgccc aagatatttg cattagttat tactgtataa cagcttatcc	2640
cccaatttag tggcttataa aataaacact tattctgaga atcagaaacc taggcaggac	2700
atagttgggg tctcatgaag ttgcactgaa aatgtccccc tgggctaatc atacggagga	2760
ctgaccaggg ctggaggatc tgttccaagc tcattcattc acatggccgt aggttggaga	2820
cagctcttct ctggatcttg gcaggagcct caattccttg tcacgtggac ctccccttgg	2880
agggggtccc atgtcctcca tggtgagtaa tccatgagag caaggtggaa ggtgccatgc	2940
catttaggac ctagcctcag gagggaccta cgtcacttct gttgtagtct gttggccaca	3000
cagactaacc ctgacacaat gcacccatcc atgacctgct gccagtccat tctccacact	3060
gtttccagaa tgatatttac ataagtaaaa ctcctcaaag gcttttgaga tttttttcc	3120
cattatagtt gatttataac ctcagaggct tttgttttct tcagcataaa aaccaagttc	3180
cttaacatag catgtaaccc actggccacc ctgccagtgg ctagaactct caccatgtcc	3240
atccttgaat actgctttct agccaagagc tattgtttgc agttcccaga atgtgtcggg	3300
ataactcaca tetetgagee titteatgig eigiteecte actitiggaat ateceettee	3360
atttaggaag gctaatgtcc attcattntc caaaactcag aagcaaattt tttttttt	3420
tittttttt tittitgct tittagggcc gaactcicag catatggagg ticccaggit	3480
agccatcaaa ttggaattgt agctgctggc ctacaccaca gccatagcaa caccagaccc	3540
aagtcacatc tgcaacctac atcacagatc atggcaatac tggatcctta acccactgag	3600
tgagcccagg gatcaaacac aaattctcat ggatactcgc caggttcatt accactgagc	3660



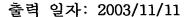


cacaacagga actcctctcc tttttatggt cacacctgca gcatatggaa gttcctgggc	3720
cagggattga atctgagtgg cagctgtgac aatgccgtat cctttaattc actgtgctgg	3780
gctgaggggn taaantgccc ctcctaaaaa acctgagctg ctgcagttgg attcttaatc	3840
cactgcacca caagggggaa ggtcaagaac tgtcttgcca tctctgtatc ttatcaccta	3900
gcatagtacc caccatagag aagttgctca acaaatgttt actgaatgaa taaatgcatg	3960
agctggagtt cccattgcgg ctcagcagta acaaacctga ctagcattca taagaacttg	4020
ggttcgatcc ctagcctcag tgggttaagg atgcagcatt gctgtgagct gtggtgtagg	4080
tcgcagacga cactcagatc ccacattgct gtcactgtgg cgcaggccgg cctctgtagc	4140
tctgattcga ctcctagcct gggaacgtcc atatgccaca ggtgaggccc taaaaagaaa	4200
taaataagca agcaagtaag caagcaggca gtttcttggt gccttgtacc cctgtggcct	4260
gtgtggtata caagtaacag ctgatccatg tctcagtcat gtttccccct cagactacct	4320
ttcctgcccc atctctccct ttgacataat tggaaaaaca aattcagaat tttgtcccac	4380
tacctttctt gctagctctg tggccttggg aaagctattt attgcctctg agcctctaat	4440
tttcatctgc accaaggatt aataaaaagg agaggataag atgaattact tatattaata	4500
tttattgaac cagatactgt gctaggcact cttaaataaa ttagcttgag tgatagtcat	4560
agtatcctgg tgagacagat ttttttttc cttttatggt tgcacgtgca acatatggaa	4620
gttcctgggc tggggtcgaa ttggagctgc aggtgcttgc ctatgccaca gccatggcaa	4680
catcatatac aaaccgcacc tgtgacctac accacagatt gcagcaacgc tggatccttc	4740
acccaaggag caaggccagg aatcaaatgt gcatcctcac aaacactatg tccggtttt	4800
aacccgctga gccacaccag gaactccatg gcgagacaga ttttatactc tgtctacaga	4860
agaggaaagt gaagctcaga atggttaggt aggtaacttg gccaagatca aaaaattcaa	4920



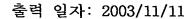


agaagatttg	gggcaagtgg	tgatatcatg	gcagcattag	aaaaaataaa	gaagcatcca	4980
cttgttttcc	aacactgaac	aactgagatt	ttcttactct	cacagctttt	tccagcttca	5040
tatccaagga	cagacgctct	gccattttcc	catcagacca	atatttgctg	aacactgcac	5100
ctttactttt	aggtccaagt	caccaggggt	tttcccagtt	tgctcctaca	gattctgaca	5160
ctatctccac	atttttttg	cacctttatt	ttaaagcatt	tttatacctg	tcataccttg	5220
ctagataaat	gggaaggaat	gaatcttccc	atttataggt	gagaaaattg	aggttcaaag	5280
tgactcacca	aaagtcatat	agcatcactc	ctcaacagga	ggacagcagt	ccccaccaga	5340
gggtaacatg	tccatggagc	ctagtggaca	catttttcta	actgactggg	aagcagcaga	5400
gtggtattgt	gaagggggaa	tcataggtat	atcaaacaga	cttaggttct	gatccgagct	5460
attctgcttg	caaacaacca	tagttcaatt	taaaaaaaaa	aaagaaagaa	agaaagaaag	5520
aaaggagccc	ccatcctggt	gcagtggaaa	caaattcaac	taggaactgt	gaggttgtgg	5580
gttcgatcco	: tggccttgct	cagtgggtta	aggatctggc	gttgccatga	gccgtggtgt	5640
aggttgcaga	ctcaactcag	atctggcgtt	gctgtgactg	g tggctgtgat	gtaggctggc	5700
agctgtaact	ccggttagac	cccagcctgg	gaacctccat	atgcaacctc	catatgcggt	5760
gggtgtggc	ctaaaaagaa	aaaaaaaaaa	aaaagaggaa	a ttcccttatg	gctcagcagg	5820
ttaaggatct	ggtattgtca	ctgctgtggc	tctagttaca	a gccatagtgc	aggttcaatc	5880
cctggcccag	g gaacgtctgo	: atcccacage	tgtggccaaa	a aaagaaagaa	aggaaggagt	5940
tctgttgtgg	g cacaatagga	ı ttggcaacat	cttaggagta	a ctgggacaca	ggttcaatcc	6000
ctggcccage	c acagtgggta	a aggagccagt	gttgctggt	c aaaaaagaaa	agaaaaagta	6060
ccatagtta	g agtaaatctg	g ttttaggago	tattctttg	g ggcagaacag	gagatcagg	6120
agctccttg	a gagcagaaa	ttacctttac	c atccctcgt;	g cctagcacgg	g ttctaggggc	6180





6240 atacctggta tttaataaat atagccaact ggatagggga ttggaaggaa agagcagggg 6300 agggaacttg agtgagttga aaaattgaga atccaaaggg gagacagcct agaaagagta 6360 ggtccaagaa agagatccca ggcatttgtg gccctggttc cctttttcca agccatgagg 6420 aaatcctcag aggaacagag tgctgtggct ttaaatgact tcagcgttgt caatgaatct 6480 gctcggctaa aagagttatc ctcttgctcc ttcgcttgtc ctccccctcc tctcagctcc 6540 ccaaaccctt ctcggctgct gtgatgggat aattagatgc gagagctcag cacagatgat 6600 gctccagttg cctagcaact aatggtttcc atggagaccg caaagcacag cctccagagc 6660 agccagtgag cagctcggca gggcagggag aagacgcaac tctcagctcc tccagaaacc 6720 tggggagggc caggagtggg gaagaagggg gggatcggag ggcttaaagg cacaggcccc 6780 tcttatcctc ttaaaatctg gtcagagctc tgccctcccc tcccctactc tgtcccactc 6840 ataatttcag atggagttgg gggcttagga gtggacccaa cacaacctac cctgcaataa 6900 acccaacctt ctttctgctt ctggtttgtg gctgaaaatg gnaaaagaaa tctcccaagt 6960 gcaagtgtaa acancntcct gggttggcaa tgggatctga agagtactaa gatccctcag 7020 acctggaatt ccaccattta gtctttccct ctctccaaag ttctcaatgt gcaaaagatc 7080 ctctttcagt ttgcagagca atgataggat cttctaaaag gagacaaaag ccaaggtgca 7140 ggaaaaatag aattcagttc ttcacccaaa ggcagcctgt cctgggagac aggggtgaaa 7200 cacttggtcc tgatctccat cagaggatcc agagtgtgtg tgtttgttgc tggggagggg 7260 gacacaatat agagcatctg gtgactcaaa gtatgtgcct cccagagtag catcaatcaa 7320 tgttacctgg aagcttgtta gaaatgcaga atttcaggct tcacctcaga cccactgaat 7380 cagaaactgc atcttaacaa gatccctcat gattcatacg cacattaaat ttggagaagc 7440 gctgacctga gaccctcctc ctctctgctt gggcccatag ttctaccttt attgtcacct





cgtctcacct	cgtgctcata	ccccaggctt	tgagcctacc	cttccccca	tggggaaagg	7500
acacaaggcc	accagcccct	cacttcccta	ccaggaccct	ggccctcctc	tgggactgga	7560
gaaggacaaa	gaggaccccc	tctgtggagg	tctacgacct	ctcctgacca	agtagtccac	7620
tcaccacaag	tggctctacc	tctctgagtc	tcagtttcca	catccacaaa	aggtggccaa	7680
tgctatctgc	cacccagaat	ggctgtgagg	gtggagcagg	caaagcctct	gtgccatcag	7740
agaaattgtg	tctcttttc	attttctccc	agtgggtttc	tttctcgtct	ttattctttt	7800
tttttttt	ttttcctgtc	tgttgtattt	ttagggccgt	gcctgtggca	tacggaagtt	7860
cccagggtag	gggtccaatg	ggagctgtag	ccccgggcct	acgccacagc	cacagcaatg	7920
tgggatctga	gccacgtctg	caacctacac	cacagctcac	ggcaacacca	gatccttaac	7980
ccactgagca	aggccaggga	tcgagcccac	gtcctcatgg	atgctagttg	ggttcgttaa	8040
ccgctgagcc	atgatgataa	ctcctctttc	tattctttag	tcacaaacag	tcaacaaagg	8100
ttgctgacca	aggctgatcg	tgcccacccc	ccagcccccc	agactgggcc	agtgcccacc	8160
ccttgggtct	ctctggaaat	cctgcccagc	atcaattggc	tccactctcc	aggaggatgg	8220
gaagccctgt	ggcccctggg	actcacaccc	ctctgcatct	cccagagtgc	aggacctggt	8280
cttcaggaga	caccaagaac	tggctccccc	ggctctgctg	ccccaccc	ctactaccag	8340
tttctctccc	attcctgccc	agtccaggcc	ccctggggtt	actctcctct	ctctgtacac	8400
cagtgcaaco	: tcagaacctg	cttccctcct	gggaacacco	: actaccacgt	gggagaaggg	8460
gtcgtctagg	ggttgggccc	: cagatacact	tgtaagcagg	g aacacacgag	g cccttacatg	8520
tgggtgtccc	ggaagaaggg	g ggttttccac	ccccgcttt	: agtcaccctg	g cccctctgca	8580
gctgcctgag	g ccaccaagac	ccagccaagg	tctcctgcct	tctggcctga	a gggccagctc	8640
cccatcctga	a aaaacctgto	tgggggccto	ccctgaggct	gtagggccca	a aggcctcccc	8700

107 077256

출력 일자: 2003/11/11

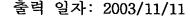
8760 tgaggctgta gggcccaagg ggcaggttga acaggattcc cctctggccc ctcctacccc 8820 caggacaaaa ccagagcccc aggacagggc ctcacttgcc tcaggaaacc acagcttgcc · 8847 <210> agcacccagc ccagcaccag cccagct Artificial Sequence <220> <223> 2 <211> 20 <212> DNA <213> forward primer for amplifying porcin uroplakin II gene <400> 2 gatcctgatt ctgctggctb 20 <210> 3 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for amplifying porcin uroplakin II gene <400> 3 atggtggtca 20 <210> 4 <211> tcacrgtgct DNA <213> Homo sapiens <300> <301> Lin, F. K. Suggs. S. 3602 <212> Browne, J. K. Smalling, R. Egrie, J. C. Lin, C. H. Stabinsky, Z. <302> Chen, K. K. Fox, G. M. Martin, F. Cloning and expression of the human erythropoietin gene <303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <304> 82 <305> 22 <306> 7580-7584 <313> 1-3602 <400> 4 aagettetgg getteeagae eeagetaett tgeggaacte ageaaceeag geatetetga 60 gtctccgccc aagaccggga tgccccccag gggaggtgtc cgggagccca gcctttccca 120 180 gatagcacge teegecagte ecaagggtge geaacegget geacteecet eeegegacee 240 agggecegg ageagecece atgacecaea egeaegtetg eageagecee geteaegeee 300 eggegageet caacceagge gteetgeece tgetetgace eegggtggee cetaceeetg 360 gcgacccctc acgcacacag cctctccccc accccaccc gcgcacgcac acatgcagat 420 aacagccccg acccccggcc agagccgcag agtccctggg ccaccccggc cgctcgctgc 480 gctgcgccgc accgcgctgt cctcccggag ccggaccggg gccaccgcgc ccgctctgct



ccgacaccgc gcccctgg	ga cagccgccct	ctcctctagg	cccgtggggc	tggccctgca	540
ccgccgagct tcccgggat	g agggccccg	gtgtggtcac	ccggcgcgcc	ccaggtcgct	600
gagggacccc ggccaggcg	gc ggagatgggg	gtgcacggtg	agtactcgcg	ggctgggcgc	660
tcccgccgcc cgggtccc	tg tttgagcggg	gatttagcgc	cccggctatt	ggccaggagg	720
tggctgggtt caaggacc	gg cgacttgtca	aggaccccgg	aagggggagg	ggggtggggc	780
agcctccacg tgccagcgg	gg gacttggggg	agtccttggg	gatggcaaaa	acctgacctg	840
tgaaggggac acagtttg	gg ggttgagggg	aagaaggttt	gggggttctg	ctgtgccagt	900
ggagaggaag ctgataag	ct gataacctgg	gcgctggagc	caccacttat	ctgccagagg	960
ggaagcetet gteacace	ag gattgaagtt	tggccggaga	agtggatgct	ggtagctggg	1020
ggtggggtgt gcacacgg	ca gcaggattga	atgaaggcca	gggaggcagc	acctgagtgc	1080
ttgcatggtt ggggacag	ga aggacgagct	ggggcagaga	cgtggggatg	aaggaagctg	1140
tccttccaca gccaccct	tc tccctccccg	cctgactctc	agcctggcta	tctgttctag	1200
aatgtcctgc ctggctgt	gg cttctcctgt	ccctgctgtc	gctccctctg	ggcctcccag	1260
tcctgggcgc cccaccac	gc ctcatctgtg	acagccgagt	cctggagagg	tacctcttgg	1320
aggccaagga ggccgaga	at atcacggtga	gaccccttcc	ccagcacatt	ccacagaact	1380
cacgctcagg gcttcagg	ga actcctccca	gatccaggaa	cctggcactt	ggtttggggt	1440
ggagttggga agctagac	ac tgcccccta	cataagaata	agtctggtgg	ccccaaacca	1500
tacctggaaa ctaggcaa	gg agcaaagcca	gcagatccta	cggcctgtgg	gccagggcca	1560
gagccttcag ggaccctt	ga ctccccgggc	tgtgtgcatt	tcagacgggc	tgtgctgaac	1620
actgcagctt gaatgaga	at atcactgtcc	cagacaccaa	agttaatttc	tatgcctgga	1680
agaggatgga ggtgagtt	cc ttttttttt	tttttccttt	cttttggaga	atctcatttg	1740



cgagcctgat tttggatgaa agggagaatg atcgggggaa aggtaaaatg gagcagcaga 1800 gatgaggctg cctgggcgca gaggctcacg tctataatcc caggctgaga tggccgagat 1860 gggagaattg cttgagccct ggagtttcag accaacctag gcagcatagt gagatcccc 1920 atctctacaa acatttaaaa aaattagtca ggtgaagtgg tgcatggtgg tagtcccaga 1980 tatttggaag gctgaggcgg gaggatcgct tgagcccagg aatttgaggc tgcagtgagc 2040 tgtgatcaca ccactgcact ccagcctcag tgacagagtg aggccctgtc tcaaaaaaga 2100 aaagaaaaaa gaaaaataat gagggctgta tggaatacat tcattattca ttcactcact 2160 cactcactca ttcattcatt cattcattca acaagtctta ttgcatacct tctgtttgct 2220 cagcttggtg cttggggctg ctgaggggca ggagggagag ggtgacatgg gtcagctgac 2280 tcccagagtc cactccctgt aggtcgggca gcaggccgta gaagtctggc agggcctggc 2340 cctgctgtcg gaagctgtcc tgcggggcca ggccctgttg gtcaactctt cccagccgtg 2400 ggagcccctg cagctgcatg tggataaagc cgtcagtggc cttcgcagcc tcaccactct 2460 gcttcgggct ctgggagccc aggtgagtag gagcggacac ttctgcttgc cctttctgta 2520 agaaggggag aagggtcttg ctaaggagta caggaactgt ccgtattcct tccctttctg 2580 tggcactgca gcgacctcct gttttctcct tggcagaagg aagccatctc ccctccagat 2640 gcggcctcag ctgctccact ccgaacaatc actgctgaca ctttccgcaa actcttccga 2700 gtctactcca atttcctccg gggaaagctg aagctgtaca caggggaggc ctgcaggaca 2760 ggggacagat gaccaggtgt gtccacctgg gcatatccac cacctccctc accaacattg 2820 cttgtgccac accetecee gecaeteetg aacceegteg aggggetete ageteagege 2880 cagcctgtcc catggacact ccagtgccag caatgacatc tcaggggcca gaggaactgt 2940 ccagagagaa actctgagat ctaaggatgt cacagggcca acttgagggc ccagagcagg 3000



540 gattgaacaa

aagcattcag agagcagctt taaactcagg gacagagcca tgctgggaag acgcctgagc 3060 tcactcggca ccctgcaaaa tttgatgcca ggacacgctt tggaggcgat ttacctgttt 3120 tegeacetae cateagggae aggatgaeet ggagaactta ggtggeaage tgtgaettet 3180 ccaggtctca cgggcatggg cactcccttg gtggcaagag cccccttgac accggggtgg 3240 tgggaaccat gaagacagga tgggggctgg cctctggctc tcatggggtc caagttttgt 3300 gtattcttca acctcattga caagaactga aaccaccaat atgactcttg gcttttctgt 3360 tttctgggaa cctccaaatc ccctggctct gtcccactcc tggcagcagt gcagcaggtc 3420 caggtccggg aaatgagggg tggaggggc tgggccctac gtgctgtctc acacagcctg 3480 tetgacetet egacetaceg geetaggeea caagetetge etaegetggt caataaggtg 3540 tetecattea aggeeteace geagtaagge agetgeeaae eetgeeeagg geaaggetge 3600 ag 3602 <210> 5 <211> 1916 <212> DNA <213> Gallus gallus <220> <221> misc_signal <222> (1)...(1916) < 223 >beta-globin insulator <400> 5 gcggccgcg gcgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 60 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 120 tcaataatat tgaaaaagga agagtcctga ggcggaaaga accagctgtg gaatgtgtgt 180 cagttagggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat 240 ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg 300 caaagcatge atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc gcccatcccg 360 cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg gctgactaat ttttttatt 420 tatgcagagg ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt 480 tttggaggcc

077256

taggcttttg caaagatcga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcat

102 077256

gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg 600 ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc 660 gcaggggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca 720 agacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct 780 cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga 840 tctcctgtca 900 gcggctgcat tctcaccttg ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat 960 cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga 1020 gcatcagggg ctcgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgagca tgcccgacgg 1080 cgaggatctc gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg 1140 ccgcttttct 1200 agcgttggct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttcct 1260 cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga 1320 cgagttcttc tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg 1380 ccatcacgag atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt 1440 ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc 1500 caccctaggg ggaggctaac tgaaacacgg aaggagacaa taccggaagg aacccgcgct 1560 atgacggcaa taaaaagaca gaataaaacg cacggtgttg ggtcgtttgt tcataaacgc 1620 ggggttcggt cccagggctg gcactctgtc gataccccac cgagacccca ttggggccaa 1680 tacgcccgcg tttcttcctt ttccccaccc cacccccaa gttcgggtga aggcccaggg 1740 ctcgcagcca acgtcggggc ggcaggccct gccatagcct caggttactc atatatactt 1800 tagattgatt



taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat
ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc cgatcg

1860 aatctcatga

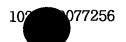
1916 <210> 6 <211>

2254 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Cloning vector

pEGFP-N1, complete sequence, enhanced green fluorescent prootein (egfp) and

neomycin phosphotransferase genes <400> gccccaggg atgtaattac gtccctccc tccgctccgg tccggcgctc ccccgcatc ggcacgggga aggtggcacg ggatcgcttt ctgcagacac ctggggggat acggggaaaa acagaatcat agaacggcct gggttgcaaa ctgctatgtg cagggtcatc aaccagcagc ccttgaatgc ctgcagggat ggggcatcca caccaccctc tgggggaaaa actgcctcct tgtaaagcca ttccccttg tcctatcaag ggtgacacat gtttgccaat tcagtgcatc tgcaggacag catggacgtg ggacatgcag cacagcgttc agaacagcct taaggataag aaaacccagc atggagagga gcacaaaaag gcctgcatgt ttgatggtgt ctggatgcaa gatacagctg ggtcagtagg actgggacag tacaatcgtc aaatcatgaa ggctggaaag

6 tcgactctag agggacagcc ccccccaaa 60 cgctaggggc agcagcgagc cgcccggggc 120 cccgagccgg cagcgtgcgg ggacagcccg 180 cctctgaacg cttctcgctg ctctttgagc 240 agctttaggc tgaaagagag atttagaatg 300 ggagcacagt gctcatccag atccaacccc 360 ccaggctgcc cagagccaca tccagcctgg 420 cagceteett gggcaacetg tteagtgegt 480 catatccaac ccaaacctcc cctgtctcag 540 ggggagtttg ctgtgacatt gttggtctgg 600 acggagaggc agatcttggg gataaggaag 660 gtgttgaggg ctctgggaca ctctccaagt 720 aagataggat agaaggacaa agagcaagtt 780 gccacagaca ctgctggtcc ctgtgtctga 840 gcagaagggg tggaagagct tgcctggaga 900 gcagctggag aattgccatg tagatgttca 960 cctccaagat ccccaagacc aaccccaacc



cacccaccgt gcccactggc catgtccctc tccagggacg gtgaccccc cacctccgtg ggagaaggta aatcttgcta aatccagccc atctctcatc caactccagg acggagtcag ccccaaagcc cccagggatg taattacgtc ccggggctcc gctccggtcc ggcgctcccc cagcccgggc acggggaagg tggcacggga tttgagcctg cagacacctg gggggatacg tagaatgaca gaatcataga acggcctggg caacccctg ctatgtgcag ggtcatcaac agcctggcct tgaatgcctg cagggatggg agtgcgtcac caccctctgg gggaaaaact gtctcagtgt aaagccattc ccccttgtcc ggtctggggt gacacatgtt tgccaattca aaggaagtgc aggacagcat ggacgtggga tccaagtcac agcgttcaga acagccttaa gcaagttaaa acccagcatg gagaggagca tgtctgagcc tgcatgtttg atggtgtctg gtgccacatc cccacagttc ttcatcacct gcagctgtgc cactgcagca ccgctctttg accetecet ggeacaacgt aaggeeatta

1020 agtgccacat ccccacagtt cttcatcacc 1080 ggcagctgtg ccactgcagc accgctcttt 1140 gaccetecce tggcacaacg taaggccatt 1200 tgaggatggg gctctagagg gacagcccc 1260 cctccccgc taggggcagc agcgagccgc 1320 ccgcatcccc gagccggcag cgtgcgggga 1380 tegettteet etgaaegett etegetgete 1440 gggaaaaagc tttaggctga aagagagatt 1500 ttgcaaagga gcacagtgct catccagatc 1560 cagcagccca ggctgcccag agccacatcc 1620 gcatccacag cctccttggg caacctgttc 1680 gcctcctcat atccaaccca aacctcccct 1740 tatcaagggg gagtttgctg tgacattgtt 1800 gtgcatcacg gagaggcaga tcttggggat 1860 catgcaggtg ttgagggctc tgggacactc 1920 ggataagaag ataggataga aggacaaaga 1980 caaaaaggcc acagacactg ctggtccctg 2040 gatgcaagca gaaggggtcc atgtccctca 2100 ccagggacgg tgacccccc acctccgtgg 2160 gagaaggtaa atcttgctaa atccagcccg 2220 teteteatee aacteeagga aeggagteag tgag



102 077256

출력 일자: 2003/11/11

DNA <213> 2254 <210> 7 <211> 632 <212> Woodchuck hepatitis B virus <220 <221> misc_signal <222> (1)..(632) <223> woodchuck hepatitus virus posttranscriptional regulatory element <400> 7 accaggitet gitectgita atcaacciet ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg 60 tattcttaac tatgttgctc cttttacgct atgtggatac gctgctttaa tgcctttgta 120 tcatgctatt gcttcccgta tggctttcat tttctcctcc ttgtataaat cctggttgct 180 gtctctttat gaggagttgt ggcccgttgt caggcaacgt ggcgtggtgt gcactgtgtt 240 tgctgacgca accccactg gttggggcat tgccaccacc tgtcagctcc tttccgggac 300 tttcgctttc cccctcccta ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgctg 360 ctggacaggg gctcggctgt tgggcactga caattccgtg gtgttgtcgg ggaagctgac 420 gtcctttcca tggctgctcg cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg 480 ctacgtccct tcggccctca atccagcgga ccttccttcc cgcggcctgc tgccggctct 540 gcggcctctt ccgcgtcttc gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc tttgggccgc 600 ctcccgcct gtttcgcctc gggctcctcg ag 632 <210> 8 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> forward primer for amplifying neomycin resistant gene <400> 8 gcggccgcgc gcgtcaggtg gcac 24 <210> 9 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for amplifying neomycin resistant gene <400> 9 cgatcggacg ctcagtggaa cgaaaactc 29 <210> 10 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> forward primer for amplifying chicken B-globin insulator <400> 10 tcgactctag agggacag 18 <210> 11 <211>



107 077256

출력 일자: 2003/11/11

Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for 18 <212> DNA <213> amplifying chicken B-globin insulator <400> 11 ctcactgact ccgttcct 18 <210> 12 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> forward primer for amplifying woodchuck hepatitus virus posttranscriptional regulatory element <400> 12 accaggttct gttcctgtta atcaacctc 29 <210> 13 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for amplifying woodchuck hepatitus virus posttranscriptional regulatory element <400> 13 ctcgaggagc ccgaggcgaa acaggcg 27